

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
BIOTEHNOLOOGIA ÕPPETOOL

Julia Bokajeva

**Inimese X kromosoomi aberratsioonide mõju X kromosoomi
inaktivatsiooni kallutatusele**

Magistritöö (40 EAP)

Biomeditsiin

Juhendajad:

Olga Tšuiko, MSc

prof. Ants Kurg, PhD

TARTU 2016

INFOLEHT

Inimese X kromosoomi aberratsioonide mõju X kromosoomi inaktivatsiooni kallutatusele

Mittejuhuslik ehk kallutatud X kromosoomi inaktivatsioon on iseloomulik mitmele X-liitelisele haigusele ja X kromosoomi aberratsioonidele. Antud töös uuriti X kromosoomi aberratsioonide mõju X kromosoomi inaktivatsiooni kallutatusele. Enamuse aberratsioonide puhul leiti juhuslik X kromosoomi inaktivatsiooni suhe. Enamike kallutatud X kromosoomi inaktivatsiooniga seotud aberratsioonide puhul leiti naisi, kellel sama aberratsiooni puhul oli X kromosoomi inaktivatsioon juhuslik. Antud uuringu käigus olulisi erinevusi X kromosoomi aberratsioonidega ja aberratsioonideta naiste X kromosoomi inaktivatsiooni kallutatuse vahel ei leitud.

Märksõnad: geedoosi kompensatsioon, X kromosoomi inaktivatsioon, X kromosoomi inaktivatsiooni kallutus, X kromosoomi aberratsioonid

CERCS B220 Geneetika, tsütogeneetika

The influence of human X chromosomal aberrations on skewing of X chromosome inactivation

Several X-linked conditions and aberrations are associated with skewed X chromosome inactivation. The aim of this thesis was to study the influence of X chromosomal aberrations on skewing of X chromosome inactivation. Random X chromosome inactivation ratio was found for the majority of aberrations. Most aberrations associated with skewed X chromosome inactivation in some women were associated with random X chromosome inactivation in others. This study could not find statistically significant differences in X chromosome inactivation between women with aberrations and women without them.

Keywords: dosage compensation, X chromosome inactivation, X chromosome inactivation skewing, X chromosomal aberrations

CERCS B220 Genetics, cytogenetics

Sisukord

INFOLEHT.....	2
LÜHENDID JA MÕISTED	5
SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1 Inimese sugukromosoomid	7
1.2 Geenidoosi kompensatsioon	7
1.2.1 Tasakaal XX ja XY vahel.....	7
1.2.2 Tasakaal X ja AA vahel.....	8
1.3 X kromosoomi inaktivatsioon.....	8
1.3.1 Inaktivatsiooni algatamine.....	9
1.3.2 Inaktivatsiooni levik	10
1.3.3 Inaktivatsiooni säilitamine.....	11
1.3.4 Inaktivatsioonist pääsemine.....	11
1.4 X kromosoomi inaktivatsiooni kallutatatus	13
1.4.1 Kallutatuse tekkemehhanismid.....	13
1.4.2 Kallutatuse seos vanusega	14
1.4.3 Kallutatuse seos X-liiteliste haigustega.....	14
1.4.4 Kallutatuse seos aberratsioonidega.....	15
1.5 X kromosoomi inaktivatsiooni suhte määramine	16
1.5.1 Metülatsiooni-põhised meetodid	16
1.5.2 Ekspressiooni-põhised meetodid	17
1.5.3 Replikatsiooni-põhised meetodid	18
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	19
2.1 Töö eesmärk.....	19
2.2 Materjal ja metoodika	19
2.2.1 Uuritud individid	19
2.2.2 Restriktsioon.....	20
2.2.3 Polümeraasi ahelreaktsioon	20
2.2.4 Fragmentanalüüs.....	21
2.2.5 Andmete analüüs	21

2.2.6	Statistiline analüüs	22
2.3	Tulemused.....	22
2.3.1	Juhuslik X kromosoomi inaktivatsioon	24
2.3.2	Kallutatud X kromosoomi inaktivatsioon.....	25
2.3.3	Äärmiselt kallutatud X kromosoomi inaktivatsioon.....	26
ARUTELU	28
KOKKUVÕTE	32
SUMMARY	33
TÄNUAVALDUSED	34
KASUTATUD KIRJANDUS	35
Kasutatud veebiaadressid	41
LISAD	42
Lisa 1. Töös kasutatud praimerite järjestused	42
Lisa 2. Informatiivsete naiste andmed	42
I grupi andmed	42
II grupi andmed	45

LÜHENDID JA MÕISTED

<i>Alu</i> element		<i>Arthrobacter luteus</i> 'e järgi nimetatud element
AR	<i>Androgen receptor</i>	Androgeeni retseptor
HUMARA	<i>Human androgen receptor gene assay</i>	Inimese androgeeni retseptori geeni analüüs
<i>LINE</i>	<i>Long intersperced nuclear element</i>	Pikk hajutatud tuumaelement
PAR	<i>Pseudoautosomal region</i>	Pseudoautosomaalne regioon
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>	Polümeraasi ahelreaktsioon
PRC	<i>Polycomb repressive complex</i>	Polycomb represseeriv kompleks
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>	Ühe nukleotiidi polümorfism
Xa	<i>Active X chromosome</i>	Aktiivne X kromosoom
XCI	<i>X chromosome inactivation</i>	X kromosoomi inaktivatsioon
Xi	<i>Inactive X chromosome</i>	Inaktiivne X kromosoom
Xic	<i>X inactivation center</i>	X inaktivatsiooni keskus
Xist	<i>X-inactive specific transcript</i>	Inaktiivse X spetsiifiline transkript

SISSEJUHATUS

X kromosoomi inaktivatsioon on ühe juhuslikult valitud kromosoomi transkriptsiooniline vaigistamine naiste somaatilistes rakkudes. Juhuslik valik tagab üldise 1:1 rakkude suhte, kus on inaktiveeritud ema- või isapoolne X kromosoom. Kõrvalekalded sellest suhtest ehk kallutatud X kromosoomi inaktivatsioon on fenotüübiliselt normaalsete naiste seas üsna harv, kuid samas iseloomulik mitmete X-liiteliste haiguste ja X kromosoomi aberratsioonide korral. Selle tagajärjel võivad X-liiteliste haiguste naiskandjad olla asümptomaatilised ja terved. Seoses sellega võib X kromosoomi inaktivatsiooni suhte määramine olla kasulik diagnostiline meetod X-liiteliste haiguste tuvastamiseks juba varases eas.

Samas ei ole X kromosoomi inaktivatsiooni protsess inimesel veel piisavalt põhjalikult uuritud. Kuna X kromosoomi inaktivatsioon toimub varases embrüonaalses arengus, siis ei ole seda võimalik põhjalikult uurida inimese embrüotel eetiliste aspektide tõttu. Seega põhinevad paljud arusaamad hiirte ja teiste imetajate peal tehtud katsete tulemustel. Samuti ei ole teada, kuidas täpselt X kromosoomi inaktivatsioon levib piki kromosoomi ja millised järjestused mängivad selles olulist rolli. X kromosoomi aberratsioonide uurimine seoses X kromosoomi inaktivatsiooni kallutatusega võimaldaks luua tervikliku pildi sellest, millised järjestused on vajalikud inaktivatsiooni kehtestamiseks ja võivad mõjutada protsessi juhuslikkust.

Käesoleva magistritöö eesmärgiks on anda kirjandusel põhinev ülevaade X kromosoomi inaktivatsiooni protsessist, selle kallutatuse tekkest ning seosest X-liiteliste haiguste ja X kromosoomi aberratsioonidega. Töö praktilise osa eesmärgiks oli uurida inimese X kromosoomi aberratsioonide seost X kromosoomi inaktivatsiooni kallutatusega.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Inimese sugukromosoomid

Inimese genoom on pakitud 46 kromosoomi, millest kaks moodustavad sugukromosoomide paari: XX naistel ja XY meestel. Inimese X kromosoom on 156 Mb suur ja sisaldab üle 1500 geeni, millest üle 800 kodeerivad valke. Inimese Y kromosoom on seevastu 57 Mb suur ja sisaldab umbes 200 geeni, millest ainult kolmandik kooderib valke^[1]. Y kromosoom on rikastatud isastele spetsiifiliste geenidega tänu selle edastamisele ainult isaste liini pidi (Skaletsky *et al.*, 2003; Livornois *et al.*, 2012). X kromosoom on seevastu rikastatud nii isas-, emas- kui ka aju-spetsiifiliste geenidega (Zechner *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2010).

Inimese X ja Y kromosoomil on jäänud kaks homoloogilist regiooni kromosoomide otstel – pseudoautosomaalsed regioonid lühemal (PAR1, *pseudoautosomal region*) ja pikemal õlal (PAR2), mis on vastavalt 2,77 Mb ja 330 kb suured^[1]. Ainult nende regioonide vahel on võimalik rekombinatsioon spermatogeneesi käigus (Ciccodicola *et al.*, 2000).

1.2 Geenidoosi kompensatsioon

Evolutsiooni käigus on imetajate X kromosoom säilitanud suhteliselt kõrge geenitiheduse, aga Y kromosoom on tunduvalt degenereerunud ja kaotanud enamiku oma geene. Selline situatsioon on viinud geenidoosi erinevusteni XX ja XY isenditel ning geenidoosi kompensatsiooni mehhanismide arengule (Graves, 2006; Livornois *et al.*, 2012). Geenidoosi kompensatsioon on tagatud X kromosoomi regulatsiooniga, mis seisneb geeniekspressiooni tasakaalustamisel (1) emaste ja isaste isendite vahel ning (2) X kromosoomi ja autosoomide vahel, kasutades erinevaid mehhanisme (Nguyen ja Disteche, 2006; Deng *et al.*, 2014).

1.2.1 Tasakaal XX ja XY vahel

Geenidoosi kompensatsioon emaste ja isaste imetajate vahel on tagatud sellega, et diploidsetes somaatilistes rakkudes jääb emastel aktiivseks ainult üks X kromosoom. Emaste teine X kromosoom vaigistatakse transkriptsiooniliselt ehk inaktiveeritakse varase embrüonaalse arengu

käigus. See võimaldab emastel ja isastel omada sarnast geeniekspressiooni taset enamike X-liiteliste geenide osas (Lyon, 1962; Johnston *et al.*, 2008).

Inimese pseudoautosomaalsetes regioonides asuvad geenid ei vaja doosi kompensatsiooni, kuna naistel ja meestel on nende geenide koopiad samapalju. Seetõttu pääsevad PAR1 geenid inaktivatsioonist, aga PAR2 geenid vaigistatakse nii naise X kromosoomil kui ka mehe Y kromosoomil (Lyon, 1962; Ciccodicola *et al.*, 2000).

1.2.2 Tasakaal X ja AA vahel

Geeniekspressiooni tasakaalustamiseks X kromosoomi ja autosoomide vahel on kirjeldatud geenide ekspressiooni ülesreguleerimine aktiivsel X kromosoomil (Nguyen ja Disteche, 2006; Disteche, 2012). Selle saavutamiseks on kaks võimalust: (1) transkriptsiooni initsiatsiooni võimendamine ja (2) transkribeeritud RNA stabiliseerimine (Deng *et al.*, 2013). Seega kaitseb X kromosoomi inaktivatsioon kahe X kromosoomiga rakke ka X-liiteliste geenide üleekspressiooni eest (Lin *et al.*, 2011; Disteche ja Berletch, 2015). Alternatiivina on võimalik saavutada tasakaal X-liiteliste ja autosomaalsete geenide ekspressiooni vahel autosomaalsete geenide allareguleerimisega (Julien *et al.*, 2012).

Paljud geenid on aga geenidoosi-tundetud – ühe koopia kaotamine ei ole letaalne – ega vaja geenidoosi kompensatsiooni (Papp *et al.*, 2003; Pessia *et al.*, 2014). Geenidoosi kompensatsioon on vajalik ainult doosi-tundlike geenide jaoks (Mank *et al.*, 2011). Nende hulka kuuluvad näiteks valgukompleksides osalevaid valke kodeerivad geenid (Pessia *et al.*, 2014). Kuna kõik X-liitelised geenid ei vaja geenidoosi kompensatsiooni ning võivad olla reguleeritud erinevalt, siis on võimalik, et selline doosi kompensatsiooni tüüp on arenenud geenide kaupa (Deng *et al.*, 2014; Pessia *et al.*, 2014).

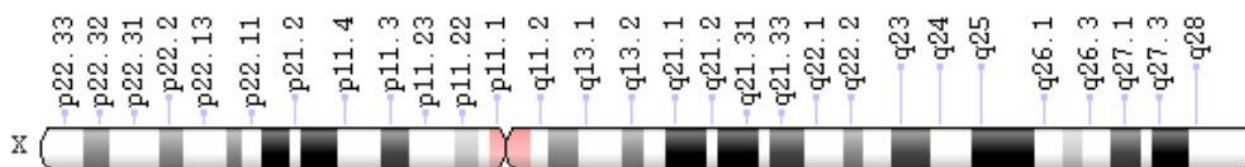
1.3 X kromosoomi inaktivatsioon

X kromosoomi inaktivatsioon (XCI, *X chromosome inactivation*) on ühe X kromosoomi inaktiveerimine emaste imetajate rakkudes, et kompenseerida geenidoosi XX emaste ja XY isaste vahel. Inaktiveeritava X kromosoomi valik toimub juhuslikult igas rakus varase embrüonaalse arengu käigus ning säilib selle raku järglastes (Lyon, 1961, 1962).

XCI toimumiseks on vaja vähemalt kaks X kromosoomi rakus (Rastan, 1983). XCI alguse määrab kudede diferentseerumise aeg. Inimesele ei ole omane varase kudede diferentseerumisega seotud XCI isapoolne imprinting, mille käigus inaktiveeritakse rakkudes ainult isalt päritud X kromosoomi (Migeon, 2016). Isapoolse X kromosoomi imprinting tekib imetajate spermatogeneesi käigus ja püsib mõnda aega pärast viljastumist (Salido *et al.*, 1992; Khalil *et al.*, 2004). Mida varem toimub liikidel kudede diferentseerumine, seda tõenäolisem on XCI isapoolse imprintingu teke (Migeon, 2016). Näiteks hiirel toimub isapoolse X kromosoomi inaktivatsioon diferentseeruvates platsenta rakkudes ning imprinting on kustutatud selleks ajaks, kui hakkavad diferentseeruma lootekoed, kus toimub juhuslik XCI (Mak *et al.*, 2004). Inimese kudede diferentseerumine algab isapoolse imprintingu kustutamisest hiljem, mis võimaldab juhuslikul XCI-l toimuda kõikides kudedes (Migeon, 2016).

1.3.1 Inaktivatsiooni algatamine

Inimese XCI protsessi võib jagada kolmeks etapiks: algatamine, levik ja säilitamine (Lyon, 1988). XCI protsessi algatab X inaktivatsiooni keskus (Xic, *X inactivation center*), mis asub X kromosoomi pikal õlal Xq13.2 regioonis (joonis 1). Xic on defineeritud kui minimaalne X kromosoomi regioon, mis sisaldab kõiki XCI algatamiseks vajalikke ja piisavaid järjestusi ning võib hõlmata kuni 1 Mb (Payer ja Lee, 2008; Gendrel ja Heard, 2014).



Joonis 1. X kromosoomi bändid^[2].

XCI protsessis mängib olulist rolli inaktiivse X kromosoomi spetsiifiline transkript (*Xist*, *X-inactive specific transcript*), mille geen asub Xic lookuses. *Xist* on 17 kb pikk mittekodeeriv RNA, mida splaissitakse ja polüadenüleeritakse, kuid mis ei sisalda avatud lugemisraami ega välju tuumast (Brown *et al.*, 1992). Hiire puhul on oluline funktsioon ka *Tsix* RNA-l, mis on transkribeeritud *antisense* suunas *Xist* suhtes. *Tsix* transkriptsioon hõlmab 40 kb pikka regiooni, kattes tervet *Xist* transkriptsiooni ühikut (Lee *et al.*, 1999).

Hiire Tsix on Xist RNA negatiivne regulaator ning tema ekspressioon takistab Xist ülesreguleerimist samal kromosoomil, muutes *Xist* promootori juures olevat kromatiini represseerivaks. Tsix funktsiooniks on hädavajalik transkriptsioon üle *Xist* promootori, kuigi täpne toimemehhanism pole teada (Sado *et al.*, 2005; Ohhata *et al.*, 2008). XCI algatamisel toimub ühel X kromosoomil Tsix allareguleerimine, mis võimaldab ekspresseerida Xist. Teise X kromosoomi Tsix pidev ekspressioon tagab selle, et kromosoom jääb aktiivseks. Pärast XCI levikut toimub ka teisel X kromosoomil Tsix RNA allareguleerimine, mis viitab sellele, et Tsix ei ole vajalik vaigistamise säilitamiseks (Sado ja Sakaguchi, 2013).

Inimese Tsix on lühendatud *Xist* neljandas intronis, enne kui ta jõuab *Xist* promootorini, mistõttu ei ole ta võimeline Xist represseerima. Lisaks sellele koekspresseeritakse inimesel Tsix ja Xist samalt (inaktiveeritavalt) X kromosoomilt (Migeon *et al.*, 2001; Migeon *et al.*, 2002).

1.3.2 Inaktivatsiooni levik

Xist katab kromosoomi, millelt ta on ekspresseeritud ja kutsub esile geenide vaigistamise (Clemson *et al.*, 1996). Xist levik üle kromosoomi algab geenirikastest ning hiljem hõlmab ka geenivaesemaid regioone. Transkriptsiooniliselt aktiivsetel regioonidel on kalduvus klasterduda tuumas ning see võib olla põhjuseks, miks esmased märklaudregioonid on ruumiliselt lähedal *Xist* lookusele, mis on samuti transkriptsiooniliselt aktiivne. Xist selektiivne seondumine on täheldatud ainult XCI kehtestamisel, millal ta suunab kromatiini ja DNA-d modifitseerivaid efekteid. Säilitamise faasis, kui inaktivatsioon on juba kehtestatud, seondub Xist ühtlaselt piki X kromosoomi (Engreitz *et al.*, 2013; Simon *et al.*, 2013).

Xist seondumine X kromosoomile toob kaasa muutuste kaskaadi. Xist molekulid moodustavad esialgu pilve, mis hõlmab osa inaktiiveeritava X kromosoomi territooriumist ja sisaldab enamasti kordusjärjestusi. Pilves on täheldatud RNA polümeraas II ja transkriptsioonifaktorite ammendumine. Hiljem toimub inaktiveeritavate regioonide koondamine sellesse vaigistatud kompartmenti (Chaumeil *et al.*, 2006; Clemson *et al.*, 2006).

Xist värbab valke, sealhulgas histoonide modifitseerivaid ensüüme nagu Polycomb represseerivad kompleksid 1 ja 2 (PRC1, PRC2, *Polycomb repressive complex*), inaktiveeritava X kromosoomi juurde, mis aitavad kaasa geenide vaigistamisele. Erinevate geenide vaigistamine toimub erineval ajal vastavalt epigeneetilistele muutustele. Varaste sündmustena toimub histoonide deatsetüleerimine, H3K27 metüleerimine PRC2 abil ja H3K119 ubikvitineerimine PRC1 abil.

Hiljem toimub histooni H2A väljavahetamine makrohistooni H2A vastu ning X-liiteliste geenide CpG saarte DNA metüleerimine kui inaktivatsiooni stabiliseerimise mehhanismid (Prothero *et al.*, 2009; Disteche ja Berletch, 2015).

X kromosoom on rikastatud pikkade hajutatud tuumaelementide *LINE-1* (*long interspersed nuclear element*) perekonna kordusjärjestustega (eriti noortega) ning nende hulk on vähemalt kaks korda suurem võrreldes autosoomidega (Bailey *et al.*, 2000). *LINE*-d on autonoomsed retrotransposoonid pikkusega umbes 6-7 kb (Goodier ja Kazazian, 2008). Kõige rohkem on *LINE-1* elemente Xq13 järjestustes, mis sisaldavad ka Xic (Bailey *et al.*, 2000). Nende ülesindatuse tõttu arvatakse, et neil võiks olla roll Xist seondumisel või vahejaamadena geeni vaigistamise levitamisel (Lyon, 1998; Bailey *et al.*, 2000).

1.3.3 Inaktivatsiooni säilitamine

Inaktiveeritud X kromosoom (Xi, *inactive X chromosome*) moodustab fakultatiivse heterokromatiini ning seda nimetatakse Barri kehaks (Barr ja Bertram, 1949; Clemson *et al.*, 1996). Xi on tihti lokaliseeritud rakutuuma perifeerias või tuumakese lähedal ehk kohtades, kuhu on koondatud autosoomide heterokromatiin. Samas ei ole Xi ühtlaselt kompaktne, vaid sellel esinevad heterokromatiini vahelised alad aktiivse kromatiiniga (Rego *et al.*, 2008). Xi-l on metüleeritud CpG saared, kuigi ülejäänud osa kromosoomist on üldiselt hüpometüleeritud võrreldes aktiivse X kromosoomiga (Xa, *active X chromosome*) (Pfeifer *et al.*, 1989; Hellman ja Chess, 2007). Inimese X kromosoomi geenidest sisaldab ainult umbes 60% promootorites CpG saari. Seega ei ole kõik geenid Xi-l stabiliseeritud metülatsiooniga (Cotton *et al.*, 2011). Xi replitseerub hiljem kui Xa ning mitoosi ajal toimub Xist dissotsieerumine kromosoomilt (Morishima *et al.*, 1962; Clemson *et al.*, 1996).

1.3.4 Inaktivatsioonist pääsemine

Xi-l ei ole kõik geenid täiesti vaigistatud. Üldiselt on inimese puhul näidatud, et umbes 15% X-liitelistest geenidest pääsevad inaktivatsioonist ja on ekspresseeritud vähemalt 10% ulatuses võrreldes aktiivse X kromosoomiga. Veel 10% geenidest varieeruvad inaktiveerituse oleku kohaselt indiviidide või kudede vahel (Carrel ja Willard, 2005).

Inaktivatsioonist pääsevaid geene võib jaotada nelja rühma (Migeon, 2016):

- 1) geenid, millel on olemas funktsionaalsed analoogid Y kromosoomil;
- 2) geenid, mis asuvad X kromosoomi pseudoautosomaalses regioonis;
- 3) geenid, mis on evolutsiooni käigus alles hiljuti ilmunud X kromosoomile ning mis ei ole veel vaigistamise mõju all;
- 4) lookused, mis on vaigistatud embrüogeneesi käigus, aga mida ekspresseeritakse mõnel määral pärast sündi.

Enamik inaktivatsioonist pääsevaid geene asub inimese X kromosoomi lühemal õlal. Üheks põhjuseks võib olla see, et lühem õlg on evolutsioonis alles hiljuti lahknunud Y kromosoomist, nii et selle regiooni geenid on alles hiljuti kaotanud oma Y paraloogi (Lahn ja Page, 1999). Alternatiivina võib tsentromeerne heterokromatiin avaldada takistust, mis hoiab ära piisava Xist kate levikut, kuna seda genereeritakse Xic-ist pikemal õlal (Disteche, 1999; Berletch *et al.*, 2010).

Inaktivatsioonist pääsevad geenid koonduvad klastriteks, mis sisaldavad vähemalt ühte Y homoloogiaga geeni (Carrel ja Willard, 2005). Inaktivatsioonist pääsevad geenid asuvad tavaliselt avatud kromatiinis, kuna nendel puuduvad CpG saared või metülatsioon promootorites, Xist RNA kate ning histoonide modifikatsioonid, mis on seotud vaigistamisega (Migeon, 2016). Inaktivatsioonist pääsevate geenide regioonid on rikastatud *Alu* (*Arthrobacter luteus*'e järgi nimetatud) elementidega ja lihtsate (GATA)n kordustega, mis võivad kaasa aidata nende pääsemisele inaktivatsioonist (McNeil *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006). *LINE-1* elemente on aga nendes regioonides vähe (Bailey *et al.*, 2000).

Inaktivatsioonist pääsevate geenide ekspressioon võib olla piiratud ümbritseva heterokromatiiniga, nii et väljaspool PAR regiooni on enamikel geenidel ekspressioonitase alla 15% võrreldes nende analoogidega aktiivsel X kromosoomil (Berletch *et al.*, 2011). Samas võib isegi vähesel määral ekspresseeritud inaktivatsioonist pääsev geen anda oma rakule kasvueelise – kui ta oleks kahjulik või ebasoodne, tema ekspressioon ei püsiks (Migeon, 2016).

X kromosoomi inaktivatsioonist pääsemise üheks tagajärjeks on muudetud geenidoos X kromosoomi aneuploidiates, milleks on näiteks 45, X (Turneri sündroom) ja 47, XXY (Klinefelteri sündroom) (Balaton *et al.*, 2015). Turneri sündroomile on iseloomulikud lühike kasv, viljatus ja somaatilised defektid, mis on ilmselt põhjustatud inaktivatsioonist pääsevate geenide puudusega (Yang *et al.*, 2011). Klinefelteri sündroomiga patsientidel on leitud mitme geeni üleekspressioon,

millega kaasneb pikem kasv ja sagedasem metaboolse sündroomi haigestumine (Zitzmann *et al.*, 2015).

1.4 X kromosoomi inaktivatsiooni kallutatus

Ema- ja isapoolse X kromosoomi inaktiveerimise tõenäosus on võrdne ning sellise juhusliku valikuga kaasneb üldine 1:1 rakkude suhe, milles on ekspresseeritud emapoolne või isapoolne X kromosoom (Lyon, 1962). Suhe varieerub normaalsete naiste populatsioonis ning sama X kromosoom võib olla eelistatult inaktiveeritud enamikes või isegi kõikides rakkudes. Sellisel juhul on tegemist tasakaalustamata ehk kallutatud X kromosoomi inaktivatsiooniga (Clerc ja Avner, 2006).

1.4.1 Kallutatuse tekkemehhanismid

XCI kallutatus võib olla primaarse või sekundaarse päritoluga. Primaarne XCI kallutatus tekib XCI algatamise ajal. Selle põhjusteks võivad olla tingimused, mis mõjutavad XCI protsessi (Sandovici *et al.*, 2004). Nendeks on mutatsioonid või variatsioonid geenides, mis osalevad XCI protsessis (Migeon, 1998; Pugacheva *et al.*, 2005). Sellisel juhul ei põhine XCI juhuslikul valikul (Clerc ja Avner, 2006). Primaarset XCI kallutatust võib põhjustada ka juhus, kui enamik rakke juhuslikult inaktiveerib sama päritoluga kromosoomi (Sandovici *et al.*, 2004). Lisaks sellele arenevad erinevad koed erinevast eellasrakkude populatsioonist, mille hulgas võib juhuslikult olla rohkem rakke sama päritoluga Xi-ga (Deng *et al.*, 2014).

Sekundaarse XCI kallutatuse põhjuseks on post-inaktivatsiooniline rakkude valik, kui esineb selektsiooniline surve mingi heterosügootse X-liitelise geeni suhtes (Migeon, 1998; Sandovici *et al.*, 2004). Selline valik võib ilmnedas igas vanuses kas kõikides kudedes või koespetsiifiliselt ning selle ulatus võib varieeruda kudede vahel (Bolduc *et al.*, 2008; de Hoon *et al.*, 2015). Samuti võib sekundaarse X kromosoomi inaktivatsiooni kallutatuse põhjuseks olla elu jooksul vähenev tüvirakkude arv, tõstes tõenäosust, et enamusel ülejäänutest tüvirakkudest on inaktiveeritud sama X kromosoom (Holstege *et al.*, 2014). Selektioon võib toimuda siis, kui naisel on näiteks üks ebanormaalne X kromosoom ja sellisel viisil säilitatakse normaalne X-liiteliste ja autosomaalsete geenide doos (Jobanputra *et al.*, 2012).

1.4.2 Kallutatuse seos vanusega

Kallutatud ja äärmiselt kallutatud XCI on tavaliselt defineeritud kui sama X kromosoomi inaktivatsioon vastavalt 75...80% ja 90...95% rakkudes (Orstavik, 2009). Äärmiselt kallutatud XCI suhe on omane alla 5% fenotüübiliselt normaalsetele naistele ning alla 1% vastsündinutele (Amos-Landgraf *et al.*, 2006). Samas on äärmiselt kallutatud XCI sagedamini leitud vanadel naistel (Busque *et al.*, 1996; Christensen *et al.*, 2000).

XCI kallutatuse seos naise vanusega võib olla seletatud kahe hüpoteesiga. Ühe hüpoteesi kohaselt suureneb XCI kallutus pärast 60-ndat eluaastat ühe indiviidi piires (Mengel-From *et al.*, 2012). Selle põhjuseks peetakse oligoklonaalset ekspansiooni piiratud tüvirakkude arvust, mis on omaette põhjustatud tüvirakkude arvu võimalikku vähenemisega vanematel naistel. XCI suhe võib erineda kudede vahel ning on võimalik, et see erinevus samuti suureneb naise vananemisel (de Hoon *et al.*, 2015).

Teise hüpoteesi kohaselt on XCI kallutus seotud naise oodatava elueaga. Näiline suurem XCI kallutus vanadel naistel on seotud sellega, et uuringutesse jõuavad naised väiksema suremusega ehk need, kes on selleks ajaks veel elus (Mengel-From *et al.*, 2012). Näiteks on leitud, et XCI suhe ei muutu oluliselt enamikel naistel 20 aasta vältel ning et väiksema XCI kallutatuse määraga võib olla seotud suurem suremus (Sandovici *et al.*, 2004; Mengel-From *et al.*, 2012).

1.4.3 Kallutatuse seos X-liiteliste haigustega

X-liitelised haigused on meestel ja naistel väga erinevate tagajärgedega. Mehed on tihti mõjutatud, kuna nendel on ainult üks X kromosoom ning ebanormaalne fenotüüp võib olla põhjustatud nii dominantse kui ka retsessiivse mutatsiooniga (Deng *et al.*, 2014). Heterosügootne naissoost dominantse X-liitelise haiguse kandja võib olla aga fenotüübiliselt terve, kui normaalne X kromosoom on aktiivne enamikes somaatilistes rakkudes või mõjutatud koes. Kallutatud X kromosoomi inaktivatsioon võib ka vastupidi muuta X-liitelise retsessiivse tunnuse dominantseks, kui normaalne alleel on inaktiivsel X kromosoomil suuremas osas rakkudest (Vacca *et al.*, 2016).

Paljude raskete X-liiteliste haiguste puhul on naiskandjad tavaliselt asümptomaatilised ja omavad äärmiselt kallutatud XCI suhet, tõenäoliselt selektsiooni tõttu. Nende haiguste hulka kuuluvad näiteks Barth sündroom, agammaglobulineemia ja raske kombineeritud immuunpuudulikkuse sündroom (Orstavik, 2009). X-liitelised haigused võivad olla seotud ka juhusliku XCI ja erineva fenotüübiga kandjates. Nende haiguste puhul on selektsioon ebatõenäoline. Kandjad naised on

tavaliselt terved ja neil on juhuslik XCI suhe. Kandjad võivad olla kergelt või harva tugevalt mõjutatud, mis on tõenäoliselt seotud juhuse tõttu vastavalt kallutatud või äärmiselt kallutatud XCI-ga. Alternatiivina võib teine, diagnoosimata X-liiteline haigus põhjustada XCI kallutatust ja rasket fenotüüpi (Migeon ja Haisley-Royster, 1998; Orstavik, 2009). Selliste haiguste hulka kuulub näiteks Duchenne lihasdüstroofia, mille puhul on XCI kallutatusega seotud suurem risk raskema fenotüübi avaldumisele. Samuti kuuluvad siia haigused, kus ei ole leitud seost fenotüübi ja XCI vahel, nagu hemofiilia A ja B ning Fabry haigus (Orstavik, 2009).

1.4.4 Kallutatuse seos aberratsioonidega

Kallutatud XCI võib toimida kui mehhanism, et vähendada kahju, kui X kromosoomil on struktuursed defektid ehk aberratsioonid nagu deletsioonid, duplikatsioonid või translokatsioonid (Li, 2011). Sellisel juhul inaktiveerub tihti defektne X kromosoom (Mercer *et al.*, 2013). Samas tagatakse X-autosoom translokatsioonide puhul autosomaalse segmendi õige geenidoos, inaktiveerides tasakaalustatud translokatsiooni puhul normaalset ja tasakaalustamata puhul mutantset X kromosoomi (Sisdelli *et al.*, 2016). Selline muster on tavaliselt korrelatsioonis normaalse või kerge fenotüübiga, kuigi lahknevused XCI suhete ja fenotüübi raskuse vahel on samuti täheldatud (Schluth *et al.*, 2007). Nende põhjuseks võib olla mittetäielik XCI kallutatus või mutantse geeni pääsemine inaktivatsioonist (Wolff *et al.*, 1997; Deng *et al.*, 2014). Kui geen pääseb inaktivatsioonist, siis XCI kallutatus võib leevendada fenotüüpi ainult osaliselt (Deng *et al.*, 2014).

Aberratsioonide hulka kuuluvad ka X rõngas- ja markerkromosoomid, mis võivad põhjustada vaimse arengu mahajäämust, kui neid ei saa inaktiveerida (Li, 2011). Markerkromosoomid võivad erineda suuruse poolest ja sisaldada erinevat hulka geneetilist materjali. Kui selline X kromosoom sisaldab X kromosoomi inaktivatsiooni keskust, võib ta alluda XCI-le. Fenotüübi raskus sõltub X markerkromosoomi suurusest ja esinemissagedusest – suurem kromosoom ja esinemissagedus põhjustavad raskemat fenotüüpi. Patsientidel on täheldatud mosaiiksus, kus defektne kromosoom esineb osades rakkudes, aga mitte kõikides. See võib olla seotud mitootilise või defektse kromosoomi struktuurse ebastabiilsusega, mistõttu ta võib kaotsi minna (Wolff *et al.*, 1994).

1.5 X kromosoomi inaktivatsiooni suhte määramine

X kromosoomi inaktivatsiooni suhte kvantitatiivseks määramiseks inimesel on kasutusel mitmed meetodid, mis baseeruvad (Vacca *et al.*, 2016)

- 1) X kromosoomi alleelide erineval DNA metülatsiooni tasemel (kaudne meetod),
- 2) ekspresseeritud polümorfismidel (otsene meetod),
- 3) DNA replikatsiooni aja analüüsil.

Metülatsiooni-põhised meetodid on laiemalt levinud, kuna DNA on kergemini kättesaadav ja stabiilsem kui RNA ning X-liiteliste geenide promootorid on inaktiivsel X kromosoomil enamasti hüpermetüleeritud (Sharp *et al.*, 2011). Meetodid on vahel ka kombineeritud (Hansen *et al.*, 2000).

Omadused, mis teevad meetodi informatiivseks ja laialt kasutatavaks (Swierczek *et al.*, 2012):

- 1) uuritav geen peab läbima XCI, nii et igas somaatilises rakus jääb ainult üks aktiivne isovorm;
- 2) uuritav geen peab olema piisavalt polümorfne, et seda oleks võimalik kasutada suuremas osas populatsioonist;
- 3) meetod peab olema kvantitatiivne, kuna XCI on varases embrüogeneesis toimuv normaalne bioloogiline protsess, kus vähesed rakud panustavad uuritavatesse kudedesse ja mis on määratud rakkude suhtega, milles on aktiivne kas emalt või isalt päritud X kromosoom;
- 4) uuritav geen peab olema laialt ekspresseeritud ja meetod peab olema piisavalt robustne, et oleks võimalik teha täpseid määramiseid erinevates kudedes.

1.5.1 Metülatsiooni-põhised meetodid

DNA metülatsiooni-põhiste lähenemiste seas on kõige üldtunnustatum ja kasutatavam inimese androgeeni retseptori (AR, *androgen receptor*) geenil analüüs (HUMARA, *human androgen receptor gene assay*). HUMARA on CpG metülatsiooni suhtes tundlikul restriктаasil põhinev polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR, *polymerase chain reaction*) analüüs, mille sihtmärgiks on lühike kordusjärjestus Xq-liitelises AR geenil (Vacca *et al.*, 2016). Metülatsiooni-tundlik restriктаas lõikab metüleerimata järjestusi, jättes metüleeritud terveks ning neid saab amplifitseerida PCR abil, kusjuures AR geenil metüleeritus Xi-l korreleerub üldise XCI-ga (Allen *et al.*, 1992; Musalkova *et al.*, 2015). Kuna ema- ja isapoolsel X kromosoomil on mõlemal 50% tõenäosus olla inaktiveeritud ja metüleeritud, siis juhusliku sündmuse korral on eeldatud suhe 1:1. XCI suhte teised väärtused, mis erinevad oluliselt teoreetilisest suhtest, peegeldavad Xi eelistatud

valikut (Vacca *et al.*, 2016). Kallutatud ja äärmiselt kallutatud XCI on tavaliselt defineeritud kui sama X kromosoomi inaktivatsioon vastavalt 75...80% ja 90...95% rakkudes (Orstavik, 2009).

Samas on *AR* geen informatiivne (polümorfne) ainult kuni 80% naistest, aga kombineerituna X kromosoomi teiste polümorfsete regioonide analüüsiga võib informatiivsete naiste hulk suureneda kuni 96%-ni (Amos-Landgraf *et al.*, 2006; Musalkova *et al.*, 2015). Erinevate geenidega saadud tulemused võivad omavahel mõnevõrra erineda (de Hoon *et al.*, 2015). Samuti on näidatud, et *AR* geeni metüleeritus ei vasta alati selle alleelide suhtelisele ekspressioonile või tõelisele XCI suhtele. Selle põhjuseks võib olla asjaolu, et kasutatava esimese eksoni metülatsiooni tase ei ulatu CpG saare või promootorini, seega võib olla tegemist mittetäieliku või ebaühtlase *AR* geeni vaigistamisega (Swierczek *et al.*, 2012).

Sõltumata geenidest kasutatakse analüüsiks kergesti kättesaadavaid suu limaskesta või vererakke (Vacca *et al.*, 2016). XCI suhte korrelatsioon ühe indiviidi kudede vahel on 0,5...0,8. Selline korrelatsioon võimaldab analüüsida alternatiivseid kudesid, kui sobiv kude ei ole kättesaadav. Samas ei saa eeldada, et ühes koes leitud XCI suhe vastab teise koe omale (Orstavik, 2009). Samuti on näidatud, et sama indiviidi kultiveeritud rakkudes on XCI rohkem kallutatud kui mittekultiveeritud rakkudes (Plagnol *et al.*, 2008). Seega tuleb X kromosoomi inaktivatsiooni analüüsi läbi viia kultiveerimata rakkude peal (Orstavik, 2009).

1.5.2 Ekspressiooni-põhised meetodid

XCI suhet võib määrata RNA tasemel, kasutades informatiivsete X-liiteliste geenide ekspresseeritud polümorfismi (näiteks *Xist*), mida saab tuvastada andmebaasi otsingutes (Rupert *et al.*, 1995; Kutsche ja Brown, 2000). Seejuures peab arvestama geeniekspressiooni mõjutavaid lisafaktoreid, näiteks *cis*-regulatoorsete elementide variante või kude-spetsiifilisi regulaatoreid. Seega, mida rohkem geene on analüüsitud, seda täpsem on XCI suhte määramine (Vacca *et al.*, 2016). Tänapäeval on võimalik määrata terve X kromosoomi ekspressioonitaset alleel-spetsiifilisel viisil, kasutades RNA sekveneerimist ja ühe nukleotiidi polümorfismide (SNP, *single nucleotide polymorphism*) analüüsi. Sekveneeritud järjestused on joondatud referents-genoomile ning järjestuste arv iga geeni jaoks on kasutatud kui selle ekspressiooni taseme määr (Mortazavi *et al.*, 2008).

1.5.3 Replikatsiooni-põhised meetodid

XCI üheks iseloomujooneks on Xi hilisem replikatsioon võrreldes aktiivse X kromosoomiga (Morishima *et al.*, 1962). Traditsiooniliselt analüüsitakse DNA replikatsiooni aja kasutades mikroskoopiat. Meetod põhineb replitseeruva DNA märgistamisel ja kromosoomide visualiseerimisel ühes rakus (Latt, 1973; Selig *et al.*, 1992). Erinevused replikatsiooni ajas Xi ja Xa vahel kombineeritakse tsütogeneetilise lähenemisega. Tsütogeneetiline analüüs on teostatav ainult siis, kui X kromosoomil on struktuursed anomaaliad (Perry ja Wolff, 1974; Vacca *et al.*, 2016). Replikatsiooni aja PCR-põhise analüüsi käigus aga märgistatakse äsja replitseerunud DNA-d bromodeoksüuridiiniga ja eraldatakse rakkudest, mida on sorteeritud vastavalt erinevatele rakutsükli staadiumitele (Hansen *et al.*, 2000). Järgmise põlvkonna DNA sekveneerimine kombineerituna SNP-põhise alleelide eristamisega võimaldab aga Xi ja Xa ajamustrite profileerimist suurema eraldusvõimega. Need genoomsed tehnoloogiad on kinnitanud, et Xi replikatsiooni mustrid võivad erineda naiste vahel (Koren ja McCarroll, 2014).

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Töö eesmärk

Minu magistritöö eesmärk oli uurida X kromosoomi aberratsioonide mõju X kromosoomi inaktivatsiooni kallutatusele, määrates inimese androgeeni retseptori geeni metülatsiooni analüüsi abil X kromosoomi inaktivatsiooni suhet naistel, kellel oli eelneva mikrokiibianalüüsi käigus leitud deletsioonid või duplikatsioonid X kromosoomil. Teiseks, võrrelda saadud tulemusi kontrollgrupi naiste omaga, kellel X kromosoomi aberratsioone ei esinenud.

2.2 Materjal ja metoodika

2.2.1 Uuritud individid

Käesolevas uuringus kasutati Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu (EGCUT) andmebaasist pärinevaid naisi, keda jaotati kaheks grupiks. I grupi (ehk uuringugrupi) moodustasid 122 naist, kelle X kromosoomis oli leitud deletsioon või duplikatsioon. II grupi (ehk kontrollgrupi) moodustasid 131 naist, kelle X kromosoomis struktuurseid defekte ei esinenud. Uuringusse ei kaasatud naisi, kelle X kromosoomi(de)s esines mitu aberratsiooni korraga. Vastavad uuringud teostati EGCUT Genotüpiseerimise tuumiklaboris, kasutades firma Illumina Inc. (San Diego, CA, USA) Human OmniExpress ja Human CoreExome BeadArray kiipe.

Antud uuringu puhul on oluline, et X kromosoomi inaktivatsiooni kallutatus suureneb naise vananedes, eriti pärast 60-ndat eluaastat (Sandovici *et al.*, 2004). Seetõttu grupeeriti uuritud naisi vanuserühmadeks (tabel 1): nooremad (18-59 aastat) ja vanemad (60-91 aastat).

Tabel 1. Naiste jaotus vanuserühma ja grupi järgi, sulgudes on rühma keskmine vanus ja standardhälve.

Vanuserühm/grupp	I	II
Nooremad (18-59)	85 (33±11)	71 (40±11)
Vanemad (60-91)	37 (72±8)	60 (74±6)

2.2.2 Restriktsioon

X kromosoomi inaktivatsiooni suhte määramiseks kasutati inimese androgeeni retseptori geeni analüüsi (HUMARA), mida teostati vererakkudest saadud DNA-l. Analüüsiks kasutati HpaII – metülatiooni-tundliku restriктаasi, mis tunneb ära C⁵CGG järjestusi inimese AR geeni esimeses eksonis ja lõikab metüleerimata alleeli. Metüleeritud alleeli amplifitseeriti polümeraasi ahelreaktsiooni abil ja teostati DNA fragmentide pikkuste analüüs.

DNA lõikamiseks kasutati 20 U restriктаasi HpaII (10 U/μl) ja 10X Tango puhvrit (Thermo Fisher Scientific). Restriktsiooniks kasutati 100 ng DNA-d, kogu reaktsiooni ruumala oli 15 μl. X kromosoomi inaktivatsiooni kallutatuse arvutamiseks on iga indiviidi kohta vaja kahte tüüpi reaktsioone: lõigatud ja lõikamata DNA-ga, mille reaktsioonisegud on siis vastavalt restriктаasiga ja ilma. Restriktsiooniks kasutati masinaid MJ Research PTC-200 Thermal Cycler (GMI Inc.) ja 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems) ning järgmist programmi mõlema tüüpi reaktsiooni jaoks: DNA lõikamine 37°C juures 12 tundi, ensüümi inaktiveerimine 65°C juures 20 minutit. Iga indiviidi analüüsiti kolmes korduses.

2.2.3 Polümeraasi ahelreaktsioon

Lõikamata AR geeni kordusjärjestuse amplifitseerimiseks teostati vastavate praimeritega PCR. Praimereid valiti Saare *et al.* (2008) tööst ning valimisel tehti kindlaks, et nende vaheline ala sisaldaks HpaII restriksiooni saiti ja (CAG)_n kordusjärjestust. Seega lõigatud alleelilt saadud fragmente on võimalik amplifitseerida ainult ühe praimeriga ning saadud produkt on tunduvalt lühem võrreldes terveks jäänud alleeliga. Primerite järjestused on toodud lisas 1. *Forward* primer on märgistatud fluorestseiiniga (Fam), mis on vajalik järgneva fragmentanalüüsi teostamiseks.

PCR läbi viimiseks kasutati FIREPol[®] DNA Polymerase reagente (Solis BioDyne): FIREPol[®] DNA polümeraas (5 U/μl), 10X puhver, 25 mM MgCl₂; dimetüülsulfoksiidi (DMSO, AppliChem) ja 2 mM nukleotiidide segu dNTP Mix (Thermo Fisher Scientific). Amplifitseerimiseks kasutati 1 μl restriksioonisegu, kogu reaktsiooni ruumala oli 20 μl.

Amplifitseerimiseks kasutati masinaid MJ Research PTC-200 Thermal Cycler (GMI Inc.) ja 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems) ning järgmist programmi:

- DNA aldenaturatsioon 95°C juures 5 minutit;
- 45 tsüklit
 - denaturatsioon 95°C juures 30 sekundit,
 - praimerite seondumine 60°C juures 30 sekundit,
 - praimerite pikendamine 72°C juures 30 sekundit;
- lõppsüntees 72°C juures 45 minutit.

PCR produktide kvaliteeti kontrolliti 1,5% agarosgeelil, kasutades markerit O'GeneRuler 50 bp DNA ladder (Thermo Fisher Scientific).

2.2.4 Fragmentanalüüs

Saadud fragmentide pikkuste kindlaks tegemiseks ja X kromosoomi inaktivatsiooni suhte arvutamiseks teostati fragmentanalüüs. Selleks kasutati 1 µl amplifikatsioonisegu, vajadusel lahjendatud vastavalt geelipildile, ning GeneScan™ 500 LIZ® Size Standard pikkusmarkerit (Thermo Fisher Scientific) ja Hi-Di formamiidi (Thermo Fisher Scientific). Fragmentanalüüs viidi läbi ja produktid analüüsiti Eesti Biokeskuse Sekveneerimise Tuumiklaboris masinal 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems).

2.2.5 Andmete analüüs

Fragmentide pikkuste analüüsimiseks kasutati vabavarana saadavat programmi Peak Scanner 2^[31]. XCI kallutatuse ulatuse välja arvutamiseks kasutati järgmisi valemeid:

$R_m = P_{m1}/P_{m2}$ ja $R_h = P_{h1}/P_{h2}$ väiksema alleeli (iseloomustatud vastava piigi kõrgusega P_1) suhte (R) arvutamiseks suuremasse (iseloomustatud P_2 -ga), kus m tähistab lõikamata ja h lõigatud DNA-ga reaktsiooni;

$R_n = R_h/R_m$ normaliseeritud suhte leidmiseks;

$R_n/(R_n + 1) * 100$ väiksema alleeli inaktivatsiooni protsenti leidmiseks.

Kuna indiviide analüüsiti kolmes korduses, siis arvutati R_m ja R_h väärtused iga reaktsiooni kohta eraldi ning nende keskmisi kasutati R_n arvutamiseks. Siin tuleb arvestada, et interpreteeritava tulemuse saamiseks peavad alleelid erinema vähemalt kahe CAG korduse võrra.

2.2.6 Statistiline analüüs

Statistiliste analüüside teostamiseks kasutati vabavarana saadavat programmi R^[4]. Vanuse mõju XCI suhete jaotusele hindamiseks kasutati mitteparameetrilist Kolmogorov-Smirnov kahepoolset testi eeldusel, et vanemate rühma XCI suhete jaotus ei pea olema normaaljaotus. Null hüpoteesina kontrolliti, et nooremate ja vanemate rühmadest naised on valitud samasuguse XCI jaotusega populatsioonidest. Mittejuhusliku ja äärmiselt kallutatud XCI esinemissagedused olid võrreldud ühepoolse Fisher'i testi abil. Null hüpoteesina kontrolliti, et mittejuhuslik ja äärmiselt kallutatud XCI esineb vanemate rühmas mitteduurema sagedusega kui nooremate rühmas. Vanuserühmade võrdlusanalüüsid teostati I ja II grupi naistele eraldi.

I ja II grupide XCI jaotuste võrdsuse hindamiseks kasutati samuti Kolmogorov-Smirnov kahepoolset testi eeldusel, et I grupi XCI suhete jaotus ei pea olema normaaljaotus. Null hüpoteesina kontrolliti, et I ja II grupi naised on valitud samasuguse XCI jaotusega populatsioonidest. Mittejuhusliku ja äärmiselt kallutatud XCI esinemissagedused olid samuti võrreldud gruppide vahel ühepoolse Fisher'i testi abil. Null hüpoteesina kontrolliti, et mittejuhuslik ja äärmiselt kallutatud XCI esineb I grupis mitteduurema sagedusega kui II grupis. Gruppide võrdlusanalüüsid teostati noorematele ja vanematele naistele eraldi.

2.3 Tulemused

Uuringus kasutati 253 naist, keda jaotati kahte gruppi. Neist 122-l oli X kromosoomis eelnevalt leitud deletsioon või duplikatsioon ning nad moodustasid uuringugrupi (I grupp). Ülejäänud 131-l X kromosoomi defekte ei esinenud ning neid uuriti kontrollgrupina (II grupp).

Kõikidele naistele teostati XCI kallutatuse analüüs. Informatiivseteks peeti neid naisi, kelle androgeeni retseptori geeni alleelid erinesid vähemalt kahe CAG korduse võrra. Informatiivsed olid 171 (67,6%) naist, neist 85 kuuluvad uuringugrupi ja 86 kontrollgrupi. Informatiivsete naiste jaotus vanuserühma järgi on toodud tabelis 2 ning täpsem informatsioon aberratsioonide ja/või XCI suhte kohta on toodud lisas 2. Enamikel mitte-informatiivsetel naistel erinesid uuritavad fragmendid ühe CAG korduse võrra ning harvemini oli tegemist sama korduste arvuga. Mitte-informatiivseid naisi andmeanalüüsi ei kaasatud.

Tabel 2. Informatiivsete naiste jaotus vanuserühma ja grupi järgi, sulgudes on rühma keskmine vanus ja standardhälve.

Vanuserühm	I grupp	II grupp
Nooremad	61 (34±11)	48 (40±12)
Vanemad	24 (73±8)	38 (75±7)

Käesolevas uuringus oli juhuslik XCI suhe defineeritud kui väiksema alleeli inaktivatsiooni vahemik 25...75%, kallutatud kui vahemikud 10...25% ja 75...90%, äärmiselt kallutatud kui vahemikud 0...10% ja 90...100% ning mittejuhuslik kui vahemikud 0...25% ja 75...100%, mis sisaldab nii kallutatud kui ka äärmiselt kallutatud inaktivatsiooni vahemike.

Vanuse mõju hindamiseks XCI-le võrreldi vanuserühmi omavahel (I ja II grupp eraldi). Statistiliste testide tulemused näitavad, et I grupi nooremad ja vanemad naised on valitud sarnase XCI jaotusega populatsioonidest (p-väärtus 0,3432) ning mittejuhuslik ja äärmiselt kallutatud XCI ei esine vanemate rühmas sagedamini kui nooremate rühmas (vastavad p-väärtused 0,3513 ja 0,134). II grupi nooremad ja vanemad naised ei ole aga valitud sarnase XCI jaotusega populatsioonidest (p-väärtus 0,04959), samas ei esine mittejuhuslik ja äärmiselt kallutatud XCI vanemate rühmas sagedamini kui nooremate rühmas (vastavad p-väärtused 0,1995 ja 0,1324).

Juhuslik XCI suhe oli tuvastatud 98-l (57,3% informatiivsetest) naisel, kallutatud 61-l (35,7%) ja äärmiselt kallutatud 12-l (7,0%) naisel. I grupis leiti juhuslik XCI 54-l (63,5%) naisel, kallutatud 26-l (30,6%) ja äärmiselt kallutatud viiel (5,9%) naisel. II grupis leiti juhuslik XCI 44-l (51,2%) naisel, kallutatud 35-l (40,7%) ja äärmiselt kallutatud seitsmel (8,1%) naisel. Tulemused vanuserühmade ja gruppide järgi on toodud tabelis 3. Statistiliste testide tulemused näitavad, et I ja II grupi nooremad naised on valitud sarnase XCI jaotusega populatsioonidest (p-väärtus 0,07802) ning mittejuhuslik ja äärmiselt kallutatud XCI ei esine I grupis sagedamini kui II grupis (vastavad p-väärtused 0,8831 ja 0,7754). I ja II grupi vanemad naised on samuti valitud sarnase XCI jaotusega populatsioonidest (p-väärtus 0,707) ning mittejuhuslik ja äärmiselt kallutatud XCI ei esine I grupis sagedamini kui II grupis (vastavad p-väärtused 0,904 ja 0,6706).

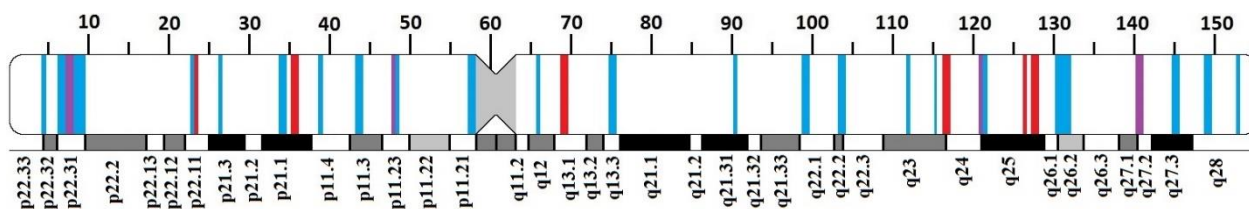
Tabel 3. X kromosoomi inaktivatsiooni kallutatus vanuserühma ja grupi järgi.

Kallutatus	Nooremad		Vanemad	
	I ja II grupp	I ja II grupp	I ja II grupp	I ja II grupp
Juhuslik	40	27	14	17
Kallutatud	19	19	7	16
Äärmuslik	2	2	3	5

2.3.1 Juhuslik X kromosoomi inaktivatsioon

Informatiivsete naiste X kromosoomi aberratsioonide ligikaudne lokaliseerimine on toodud joonisel 2. Enamus uuritud aberratsioone on vähemalt osaliselt omavahel kattuvad (ehk neil on vähemalt üks ühine ots), samas on ka neid, mis üldse ei kattu ühtegi teisega. XCI eest vastutav X inaktivatsiooni keskus asub inimese X kromosoomil Xq13.2 regioonil^[1], kus aberratsioone ei ole.

Juhuslik X kromosoomi kallutatus on omane Xp22.32, Xp11.4, Xp11.3, Xq12, Xq13.1, Xq13.3, Xq21.31, Xq22.1, Xq22.2, Xq23 ning Xq25 regioonidele. Nendes regioonides on 16 duplikatsiooni ja ainult 2 deletsiooni. Teistes regioonides olevate aberratsioonidega kaasneb X kromosoomi inaktivatsiooni kallutatus või varieeruvus X kromosoomi inaktivatsiooni suhtes naiste vahel – osadel on inaktivatsioon juhuslik, teistel kallutatud või äärmiselt kallutatud. Lisaks sellele on 69 (81,2%) uuritud aberratsiooni seotud kas valgu kodeeriva või RNA geeniga ning ainult 16 (18,8%) aberratsiooni puhul ei ole regioonis geene. Informatsioon aberratsioonide algus- ja lõpp-punktide, nende pikkuste ja vastavates regioonides paiknevate geenide kohta on toodud lisas 2.



Joonis 2. Uuritavate X kromosoomi aberratsioonide ligikaudne lokaliseerimine. Ülemise osa numbrid tähistavad positsiooni Mb-des. Halliga on märgitud tsentromeer. Punasega on märgitud regioonid, kus esinevad deletsioonid; sinisega on märgitud regioonid, kus esinevad duplikatsioonid; violetsega on märgitud regioonid, kus esinevad nii deletsioonid kui ka duplikatsioonid. Alumises osas on toodud lokaliseerimine vastavalt X kromosoomi bändidele.

2.3.2 Kallutatud X kromosoomi inaktivatsioon

Kallutatud X kromosoomi inaktivatsiooni suhte puhul on kuus regiooni, kus kattuvaid aberratsioone ei ole. Nendeks on Xp22.11 (X: 23031264...23135355), Xp21.3 (X: 26240406...26472204), Xp21.1 (X: 33643684...34333522), Xq23 (X: 111644502...111828653), Xq27.3 (X: 144955839...145401263) ja Xq28 (X: 152503241...152727361) regioonid. Ainult Xp22.11 regiooni puhul on tegemist deletsiooniga, teistes regioonides on duplikatsioonid. Xp22.11, Xp21.3, Xq23 ja Xq28 regioonides olevad aberratsioonid esinevad nooremate vanuserühmas ning Xp21.1 ja Xq27.3 regioonide aberratsioonid esinevad vanemate vanuserühmas. Xp21.3 on nendest ainuke regioon, kus ei ole geene.

Kattuvate aberratsioonidega regioonides on enamik aberratsioone kas täiesti või suuremal määral kattuvad, kuid on ka üksikud sellised, mille puhul ühtegi kattuvat ei ole. Kahel kallutatud X kromosoomi inaktivatsiooni suhtega nooremal naisel asuvad duplikatsioonid Xp22.31 regioonis ning osaliselt kattuvad omavahel (X: 6497085...6864358 ja X: 6507158...8135053). Nende puhul on olemas neli täiesti kattuvat duplikatsiooni (kolm positsioonides X: 6456940...8135053, üks positsioonis X: 6497085...8135053). See tähendab, et neljal naisel on samasugune (algus- ja lõpp-punkti järgi) või veelgi suurem duplikatsioon. Nendel naistel on juhuslik X kromosoomi inaktivatsiooni suhe. Veel kahel naisel on osaliselt kattuvad duplikatsioonid (X: 6470011...6837426 ja X: 6497085...6664300) ning juhuslik X kromosoomi inaktivatsiooni suhe. Teise duplikatsiooni puhul on veel kahel naisel osaliselt kattuvad duplikatsioonid (X: 7819527...7980930 ja X: 8076813...8432715) ning samuti juhuslik X kromosoomi inaktivatsiooni suhe. Samas regioonis asub ka deletsioon (X: 7335191...7478218), mille puhul kattuvaid deletsioone ei ole, kuigi umbes 80 kb eemal on teine deletsioon (X: 7566613...7820766), mille puhul on X kromosoomi inaktivatsiooni suhe juhuslik. Samas ei ole selle deletsiooni regioonis geene. Mõlemad deletsioonid kuuluvad vanemate vanuserühmast naistele. Selles regioonis esineb ka mittekattuv duplikatsioon, mis ei hõlma samuti geene ning naisel on leitud juhuslik X kromosoomi inaktivatsiooni suhe.

Ühe noorema naise puhul asub duplikatsioon Xp22.11 regioonis (X: 22818110...22876079), kus kahel teisel naisel on samasuguse duplikatsiooni puhul juhuslik X inaktivatsiooni suhe. Neljal nooremal naisel asuvad kattuvad deletsioonid Xq24-q25 regioonis (kaks X: 120819108...120920493, üks X: 120819108...120930090, üks X: 120860880...120920493) ning viiel kattuva deletsiooniga (üks X: 120803943...120930090, kolm X: 120819108...120920493,

üks X: 120860880...120920493) naisel on juhuslik X kromosoomi inaktivatsioon. Samas regioonis asub ka duplikatsioon (X: 120629826...121300517) ühel nooremal naisel ning kattuvad duplikatsioonid puuduvad. Ühel nooremal naisel asub duplikatsioon Xq26.2 (X: 130826305...130949827) regioonis ning kahel teisel on veelgi suurema duplikatsiooni (X: 130478545...130949827 ja X: 130894958...131510113) puhul juhuslik X kromosoomi inaktivatsioon. Xq28 regioonis on kolm mittetäielikult kattuvat duplikatsiooni, millest kahe (X: 148652476...149369250 ja X: 148888090...149013963) puhul on leitud kallutatud X kromosoomi inaktivatsioon. See on omane ühele nooremale ja ühele vanemale naisele.

2.3.3 Äärmiselt kallutatud X kromosoomi inaktivatsioon

Äärmiselt kallutatud X kromosoomi inaktivatsiooni suhtega naiste vanused ja aberratsioonid on toodud tabelis 4. Kahe naise puhul asuvad deletsioonid regioonides Xp21.1 (X: 35302556...35593186) ja Xq28 (X: 154078946...154835342), kus kattuvaid aberratsioone ei ole. Antud regioonides on leitud ka mitmeid väikeseid polümorfisme^[5]. Xp21.1 deletsioon asub kohas, kus ei ole geene ning Xq28 deletsioon vastupidi hõlmab rohkem geene kui kõik teised aberratsioonid.

Kahe naise puhul asuvad aberratsioonid regioonides Xp11.23 (X: 47911871...47970295) ja Xq27.2 (X: 140348507...140559665), kus on olemas täiesti kattuvad sama tüüpi aberratsioonid. Esimesel juhul on selliseid naisi 11 (viis X: 47881362...47970727, üks X: 47881362...48117763, kolm X: 47911871...47970727, kaks X: 47911871...47972602 deletsiooni), neist kuuel on kallutatud ja viiel juhuslik X kromosoomi inaktivatsiooni suhe. Kahel naisel on mõnevõrra suurem duplikatsioon samas regioonis (mõlemad X: 47911871...47970727) ning samuti juhuslik X kromosoomi inaktivatsiooni suhe. Teisel juhul on üks samasuguse duplikatsiooniga (X: 140348507...140559665) naine, kellel on juhuslik X kromosoomi inaktivatsiooni suhe, ning kuus naist peaaegu täiesti kattuva duplikatsiooniga (viis X: 140349251...140559503, üks X: 140376252...140559503), kellest viiel on juhuslik ja ühel kallutatud X kromosoomi inaktivatsiooni suhe. Kahel naisel on mõnevõrra suurem deletsioon samas regioonis (X: 140348507...140759327 ja X: 140349251...140786490) ning samuti juhuslik X kromosoomi inaktivatsiooni suhe. Lisaks sellele on Xp11.23 ja Xq27.2 regioonidele omane mitu polümorfismi, mis hõlmavad kuni tervet uuritavat regiooni. Need aberratsioonid hõlmavad vastavalt 1 ja 3 geeni.

Ühel naisel asub duplikatsioon Xp11.21 regioonis (X: 57432689...57928734), kus on olemas osaliselt kattuv duplikatsioon (X: 57801922...58483247) teisel, vanemate rühmast naisel. Sellel naisel on kallutatud X kromosoomi inaktivatsiooni suhe ning tema duplikatsioon on osaliselt kattuv veel kolmanda naise omaga (X: 58339545...62038249), kellel on juhuslik X kromosoomi inaktivatsiooni suhe. Ka sellele regioonile on omased mõned polümorfismid. See regioon asub X kromosoomi tsentromeeri juures.

Tabel 4. Äärmiselt kallutatud X kromosoomi inaktivatsiooni suhtega naiste andmed. Koopiaarv 1 tähistab deletsiooni, 3 tähistab duplikatsiooni. Geenide esimene number tähistab valke kodeerivaid geene ja teine number RNA geene vastavas regioonis, „-“, tähistab vastavate geenide puudumist.

Kood	Vanus	Koopiaarv	Algus (bp)	Lõpp (bp)	Pikkus (bp)	Geenid	XCI
022	75	1	35 302 556	35 593 186	290 631	-/-	8,26
032	21	1	47 911 871	47 970 295	58 425	1/-	9,49
040	42	3	57 432 689	57 928 734	496 046	4/-	99,66
070	66	3	140 348 507	140 559 665	211 159	1/2	8,60
085	71	1	154 078 946	154 835 342	756 397	31/7	7,87

ARUTELU

X kromosoomi inaktivatsioon on geenidoosi kompensatsiooni mehhanism naiste ja meeste vahel, mis tagab sarnase geeniekspressiooni taseme enamike X-liiteliste geenide jaoks. Naiste üks X kromosoom inaktiveeritakse varase embrüonaalse arengu käigus ning tehtud valik säilib selle raku järglastes. Ema- ja isapoolse X kromosoomi valik inaktivatsiooniks on juhuslik ning sellega kaasneb 1:1 rakkude suhe, milles on inaktiveeritud sama päritoluga X kromosoom (Lyon, 1961, 1962). Samas varieerub see suhe normaalsete naiste populatsioonis ning sama X kromosoom võib olla inaktiveeritud enamikes või kõikides rakkudes, põhjustades kallutatud X kromosoomi inaktivatsiooni suhet (Amos-Landgraf *et al.*, 2006; Clerc ja Avner, 2006). Samuti võib X kromosoomi inaktivatsioon toimida naistel kui kaitsemehhanism X kromosoomi defektide ja aberratsioonide korral (Li, 2011). Sellisel juhul inaktiveeritakse eelistatult defektse X kromosoomi või toimub rakkude selektsioon, kui ta põhjustab aktiivses olekus rakkude kasvu aeglustumist või peetust, ning normaalse aktiivse X kromosoomiga rakud kasvavad üle (Sandovici *et al.*, 2004; Mercer *et al.*, 2013). Seetõttu võivad X-liiteliste haiguste puhul naiskandjad olla asümptomaatilised ja omada äärmiselt kallutatud X kromosoomi inaktivatsiooni suhet. Samuti võivad X-liitelised haigused aga olla seotud juhusliku X kromosoomi inaktivatsiooniga (Orstavik, 2009).

Antud töös on läbi viidud pilootkatse, mille eesmärgiks oli uurida X kromosoomi aberratsioonide mõju X kromosoomi inaktivatsiooni kallutatusele. Selleks määrati naistel vererakkude X kromosoomi inaktivatsiooni suhet HUMARA abil ning võrreldi seda X kromosoomi aberratsioonidega naiste ja aberratsioonideta naiste vahel. Pilootkatses ei ole teostatud kõik uuringu jaoks plaanitud katsed ja analüüsid.

Naised jaotati kahte vanuserühma, kuna 60-aastastel ja vanematel naistel leitakse sagedamini X kromosoomi inaktivatsiooni kallutatust võrreldes nooremate naistega (Sandovici *et al.*, 2004). Selle kontrollimiseks võrreldi vanuserühmad omavahel (I ja II grupp eraldi). I ehk uuringugrupi puhul leiti, et X kromosoomi inaktivatsiooni jaotus ei olnud erinev nooremate ja vanemate naistel populatsioonis (p-väärtus 0,3432) ning kallutatud X kromosoomi inaktivatsioon ei esine vanematel naistel sagedamini kui noorematel. II ehk kontrollgrupi puhul aga leiti, et nooremate ja vanemate naiste populatsioonid erinevad X kromosoomi inaktivatsiooni jaotuse suhtes (p-väärtus 0,04959), samas ei esine mittejuhuslik ja äärmiselt kallutatud X kromosoomi inaktivatsioon vanemate seas sagedamini. Selline tulemus võib tunduda vastuoluline, aga seda võib tõlgendada nii, et vanemate

populatsioonis on tõesti olemas kõrvalekalle 1:1 ehk 50:50 suhtest, aga meie valimis jääb see ikkagi 25...75% vahemikku. Selliste tulemuste põhjuseks on tõenäoliselt suhteliselt väike valim.

Antud uuringus olid informatiivsed 67,6% naistest, mis on tunduvalt vähem kui oodatud 80% (Amos-Landgraf *et al.*, 2006). Selle põhjuseks on tõenäoliselt mittepiisavalt suur valim. Mitteinformatiivsete naiste puhul on võimalik edasise uuringu käigus teostada analüüs teisi lookuseid kasutades, mis alluvad X kromosoomi inaktivatsioonile.

Üldiste tulemuste järgi on I grupis 63,5% naisi juhusliku, 30,6% kallutatud ja 5,9% äärmiselt kallutatud X kromosoomi inaktivatsiooni suhtega. II grupis on aga 51,2% naisi juhusliku, 40,7% kallutatud ja 8,1% äärmiselt kallutatud X kromosoomi inaktivatsiooni suhtega. Selle põhjuseks võib olla asjaolu, et II grupis oli rohkem vanemaid inimesi. Samas on sarnane tendents ka nooremate rühmades, kus I ja II grupi vahel on samapalju naisi kallutatud ja äärmuslikult kallutatud X kromosoomi inaktivatsiooni suhtega, kuid II grupis on vähem inimesi juhusliku X kromosoomi inaktivatsiooni suhtega. Seetõttu on võimalik, et ka selle põhjuseks on suhteliselt väike valim.

Antud uuringu tulemuseks oodati, et X kromosoomi aberratsioonidega naistel esineb kallutatud või äärmiselt kallutatud X kromosoomi inaktivatsiooni suhe, mistõttu erineb X kromosoomi inaktivatsiooni suhte jaotus aberratsioonidega naiste populatsioonis. Tegelikult aga ei suudetud tõestada, et I ja II grupi jaotused on erinevad nooremate (p -väärtus 0,07802) ja vanemate (0,707) rühmades. Selle põhjusteks võib olla see, et X kromosoomi aberratsioonidega naistel tõesti ei esine X kromosoomi inaktivatsiooni kallutatus sagedamini kui normaalsetel naistel või et meie valim on liiga väike, et vastupidist tõestada. Mittejuhuslik ja äärmiselt kallutatud X kromosoomi inaktivatsiooni sagedasem esinemine I grupis ei olnud samuti tõestatud nooremate ega vanemate rühmas.

Üle 80% aberratsioone meie uuringus hõlmasid vähemalt ühte valku kodeerivat või RNA geeni, samas oli enamuse aberratsioonide puhul täheldatud juhuslik X kromosoomi inaktivatsioon. Seega ei mõjuta need aberratsioonid X kromosoomi inaktivatsiooni protsessi ega tõenäoliselt põhjusta raskeid X-liitelisi haigusi. Samas ei saa välistada, et tegemist võib olla X-liiteliste haiguste grupiga, millele ei ole omane X kromosoomi inaktivatsiooni kallutatus. Kuna tegemist on pilootkatsega, siis terviseandmed naiste kohta puuduvad ning mõjutatud geenide seost haigustega ei vaadatud. Edasise uuringu käigus tuleks kindlasti kontrollida ka neid.

Kallutatud ja äärmiselt kallutatud X kromosoomi inaktivatsiooniga naiste seas on mitu sellist, kelle aberratsioon asub regioonil, kus ei ole kattuvaid aberratsioone. Sellisel juhul ei ole võimalik öelda,

kas see on juhuslikult kallutatud või on see antud aberratsiooni tõttu. Äärmiselt kallutatud X kromosoomi inaktivatsiooni puhul on kaks sellist deletsiooni vanematel naistel. Xp21.1 (X: 35302556...35593186) deletsioon ei hõlma ühtegi geeni ning äärmiselt kallutatud X kromosoomi inaktivatsioon on tõenäoliselt põhjustatud vanusega. Xq28 (X: 154078946...154835342) regioonis asuva deletsiooni puhul on aga märkimisväärne see, et antud deletsioon hõlmab üle 30 geeni, mistõttu võib oletada, et äärmiselt kallutatud X kromosoomi inaktivatsioon on põhjustatud mitte vanusega, vaid ikkagi ühe või mitme geeni deletsiooniga.

Enamik kallutatud ja osa äärmiselt kallutatud X kromosoomi inaktivatsiooniga seotud aberratsioone esinevad regioonides, kus on olemas ka kattuvad sama tüüpi aberratsioonid. Sellisel juhul on alati vähemalt üks naine, kellel on sama aberratsiooniga juhuslik X kromosoomi inaktivatsiooni suhe. Seega on selline kallutatud tõenäoliselt põhjustatud juhusega või mitme naise puhul seoses vanadusega, kuigi enamik neist on leitud nooremate naiste seas. Nendes regioonides esinevad duplikatsioonid ja deletsioonid võivad olla seotud polümorfismidega.

Xp11.21 (X: 57432689...57928734) regioon on kolm osaliselt kattuvat aberratsiooni, mille puhul on ühel naisel juhuslik, teisel (vanemate rühmast) kallutatud ja kolmandal äärmiselt kallutatud X kromosoomi inaktivatsiooni suhe. See regioon asub aga tsentromeeri lähedal ning eelnev mikrokiibianalüüs võis anda valepositiivset vastust selle regiooni kohta. Seega oleks kindla vastuse saamiseks antud regioonis asuvaid aberratsioone valideerida.

Antud uuringul on ka mitmed piirangud. Esiteks, sobivaid naisi valiti eelnevalt teostatud mikrokiibianalüüsi tulemuste põhjal. Kuna mikrokiibianalüüsil ei ole võimalik tuvastada tasakaalustatud translokatsioone või inversioone, siis on antud uuringus kasutatud aberratsioonidena ainult deletsioonid ja duplikatsioonid. Samuti ei ole võimalik tuvastada aberratsioone, mis on väiksemad kui 50 kb, mistõttu on siin toodud enamasti suured deletsioonid ja duplikatsioonid. Teiseks, X kromosoomi inaktivatsiooni suhte määramiseks kasutatud HUMARA ei ole otsene meetod. Samuti ei vasta androgeeni retseptori geeni metüleeritus alati tõelisele X kromosoomi inaktivatsiooni suhtele, kui on tegemist mittetäieliku või ebaühtlase geeni vaigistamisega. Kolmandaks, kuigi leitud X kromosoomi aberratsioonid esinevad tõenäoliselt kõikides organismi rakkudes, võib X kromosoomi inaktivatsiooni suhe erineda kudede vahel. See tähendab, et vererakkudes määratud X kromosoomi inaktivatsiooni suhe ei pruugi olla sama mis teistes kudedes. Seega ka juhusliku X kromosoomi inaktivatsiooni suhtega veres, ei saa välistada, et see aberratsioon ei mõjuta teisi kudesid, kus X kromosoomi inaktivatsiooni suhe võib olla

kallutatud või äärmiselt kallutatud tänu selektsioonile. Neljandaks, on valimi suurus suhteliselt väike. Seetõttu peab olema ettevaatlik tulemuste interpreteerimisel.

Antud pilootkatse ei leidnud statistiliselt olulisi erinevusi uuritavate gruppide vahel (v.a. vanuse mõju kontrollgrupis) ning oli seotud mitme piiranguga. Osadest piirangutest on aga võimalik lahti saada suurema uuringu läbiviimisel, kasutades suuremat valimit ja lisalookusi X kromosoomi inaktivatsiooni määramiseks. Edasise uuringu puhul on samuti oluline kasutada ka naiste tervislike andmeid ning uurida geene, mis esinevad aberratsioonide piirkondades. Sellisel juhul oleks võimalik saada terviklikuma pildi X kromosoomi aberratsioonide mõju kohta X kromosoomi inaktivatsiooni kallutatusele.

KOKKUVÕTE

X kromosoomi inaktivatsioon on ühe juhuslikult valitud X kromosoomi vaigistamine naiste somaatilistes rakkudes, mis tagab naistel ja meestel sarnase geeniekspressiooni taseme enamike X-liiteliste geenide jaoks. Mõnede X-liiteliste haiguste ja X kromosoomi aberratsioonide puhul on täheldatud mittejuhuslik ehk kallutatud XCI. XCI kallutatuse seost X-liiteliste haiguste ja aberratsioonidega uuritakse juba aastaid, et kasutada saadud teadmisi uute diagnostiliste meetodite väljatöötamiseks.

Antud töös on kirjeldatud pilootkatse, mille eesmärgiks oli uurida X kromosoomi aberratsioonide (deletsioonide ja duplikatsioonide) mõju XCI kallutatusele. Selleks määrati naistel XCI suhet HUMARA abil ning võrreldi seda X kromosoomi aberratsioonidega naiste ja aberratsioonideta naiste vahel. Esialgselt kasutati uuringus 122 X kromosoomi aberratsiooniga (I grupp) ning 131 aberratsioonideta naist (II grupp), keda jagati vanuserühmadesse, kuna vanematel naistel on sagedamini täheldatud juhuslikult tekkinud kallutatud XCI suhe. Vanuse mõju XCI-le oli aga tõestatud ainult II grupis.

HUMARA meetodi suhtes olid informatiivsed 67,6% naistest. Kuigi üle 80% informatiivsete naiste aberratsioone hõlmasid vähemalt ühte geeni, oli XCI enamuse aberratsioonide puhul juhuslik, mis viitab sellele, et need regioonid ei mängi olulist rolli XCI protsessis. Nende seost fenotüübiga tuleks kontrollida edasise uuringu käigus. Kallutatud ja äärmiselt kallutatud XCI-ga naistel esinesid omavahel kattuvad samat tüüpi või ühtegi teisega mittekatuvad aberratsioonid. Kattuvate aberratsioonide gruppide puhul leiti alati vähemalt ühel naisel juhuslik XCI, mis viitab sellele, et kallutatud XCI võis tekkida juhuslikult. Mittekattuvate aberratsioonidega naiste puhul ei ole võimalik öelda, kas nende kallutatud XCI on põhjustatud juhuse või aberratsiooni poolt, eriti vanemate naiste puhul.

Antud pilootkatse käigus ei suudetud leida statistiliselt olulisi erinevusi X kromosoomi aberratsioonidega ja aberratsioonideta naiste vahel. Suuremaks piiranguks oli suhteliselt väike valim. Suurema uuringu läbiviimisel on võimalik kasutada suuremat valimit ning tõsta informatiivsete naiste hulka, kasutades XCI määramiseks lisalookusi. Lisaks sellele on oluline analüüsida ka naiste fenotüübilisi andmeid ning aberratsioonide piirkondades esinevaid gene.

The influence of human X chromosomal aberrations on skewing of X chromosome inactivation

Julia Bokajeva

SUMMARY

X chromosome inactivation is the process of silencing one randomly chosen X chromosome in female somatic cells, thereby providing a similar gene expression level for most X-linked genes in males and females. Some X-linked diseases and aberrations can cause non-random or skewed XCI. The association between X-linked conditions and skewed XCI has been studied for several years in order to use the acquired knowledge in the development of new diagnostic methods.

This thesis describes a pilot test, which was designed to study the influence of X chromosomal aberrations (deletions and duplications) on the process of XCI. This was done by measuring the XCI ratio using the HUMARA assay and comparing the ratio between two groups of women. Group I was originally comprised of 122 women with X chromosomal aberrations, whereas group II was comprised of 131 women without X chromosomal aberrations. Studied women were also divided into age groups, since skewed XCI is more often observed in older women. The effect of age on XCI, however, was proven only for group II.

Only 67,6% of all women were informative for the HUMARA assay. Although more than 80% of informative women had aberrations that involved at least one gene, the XCI ratio for the majority of them was random. This indicates that these regions do not play a crucial role in the process of XCI. Further studies should also check phenotypic data for associations with aberrations. Women with skewed or extremely skewed XCI had either overlapping aberrations of the same type or non-overlapping aberrations. In case of overlapping aberrations, there was always at least one woman in the group that had random XCI, which implies that skewed XCI may have been acquired by chance. For women with non-overlapping aberrations, it is not possible to say whether skewed XCI was caused by chance or the aberration itself. This is especially true for older women.

This pilot study could not find statistically significant differences between the two groups of women. Its greatest constraint was a relatively small sample. Further studies could use a larger sample and increase the number of informative females by using alternative loci to measure XCI ratio. Furthermore, it is important to analyze phenotypic data and genes in the regions of studied aberrations.

TÄNUAVALDUSED

Kõige enam soovin tänada oma juhendaid prof. Ants Kurge ja Olga Tšuiiko abistavate nõuannete ja toetuse eest magistritöö kirjutamisel. Samuti Margit Nõukast, Merle Külaotsa, Olavi Reinsalu ja Tõnis Orgu nende toetuse ja väärtuslike soovitude eest.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Allen R. C., Zoghbi H. Y., Moseley A. B., Rosenblatt H. M. and Belmont J. W. (1992). *Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation*. Am J Hum Genet 51(6): 1229-1239.
- Amos-Landgraf J. M., Cottle A., Plenge R. M., Friez M., Schwartz C. E., Longshore J. and Willard H. F. (2006). *X chromosome-inactivation patterns of 1,005 phenotypically unaffected females*. Am J Hum Genet 79(3): 493-499.
- Bailey J. A., Carrel L., Chakravarti A. and Eichler E. E. (2000). *Molecular evidence for a relationship between LINE-1 elements and X chromosome inactivation: the Lyon repeat hypothesis*. Proc Natl Acad Sci U S A 97(12): 6634-6639.
- Balaton B. P., Cotton A. M. and Brown C. J. (2015). *Derivation of consensus inactivation status for X-linked genes from genome-wide studies*. Biol Sex Differ 6: 35.
- Barr M. L. and Bertram E. G. (1949). *A morphological distinction between neurones of the male and female, and the behaviour of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis*. Nature 163(4148): 676.
- Berletch J. B., Yang F. and Disteche C. M. (2010). *Escape from X inactivation in mice and humans*. Genome Biol 11(6): 213.
- Berletch J. B., Yang F., Xu J., Carrel L. and Disteche C. M. (2011). *Genes that escape from X inactivation*. Hum Genet 130(2): 237-245.
- Bolduc V., Chagnon P., Provost S., Dube M. P., Belisle C., Gingras M., Mollica L. and Busque L. (2008). *No evidence that skewing of X chromosome inactivation patterns is transmitted to offspring in humans*. J Clin Invest 118(1): 333-341.
- Brown C. J., Hendrich B. D., Rupert J. L., Lafreniere R. G., Xing Y., Lawrence J. and Willard H. F. (1992). *The human XIST gene: analysis of a 17 kb inactive X-specific RNA that contains conserved repeats and is highly localized within the nucleus*. Cell 71(3): 527-542.
- Busque L., Mio R., Mattioli J., Brais E., Blais N., Lalonde Y., Maragh M. and Gilliland D. G. (1996). *Nonrandom X-inactivation patterns in normal females: lyonization ratios vary with age*. Blood 88(1): 59-65.
- Carrel L. and Willard H. F. (2005). *X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females*. Nature 434(7031): 400-404.
- Chaumeil J., Le Baccon P., Wutz A. and Heard E. (2006). *A novel role for Xist RNA in the formation of a repressive nuclear compartment into which genes are recruited when silenced*. Genes Dev 20(16): 2223-2237.
- Christensen K., Kristiansen M., Hagen-Larsen H., Skytthe A., Bathum L., Jeune B., Andersen-Ranberg K., Vaupel J. W. and Orstavik K. H. (2000). *X-linked genetic factors regulate hematopoietic stem-cell kinetics in females*. Blood 95(7): 2449-2451.
- Ciccodicola A., D'Esposito M., Esposito T., Gianfrancesco F., Migliaccio C., Miano M. G., Matarazzo M. R., Vacca M., Franze A., Cuccurese M., Cocchia M., Curci A., Terracciano A., Torino A., Cocchia S., Mercadante G., Pannone E., Archidiacono N., Rocchi M.,

- Schlessinger D. and D'Urso M. (2000). *Differentially regulated and evolved genes in the fully sequenced Xq/Yq pseudoautosomal region*. Hum Mol Genet 9(3): 395-401.
- Clemson C. M., Hall L. L., Byron M., McNeil J. and Lawrence J. B. (2006). *The X chromosome is organized into a gene-rich outer rim and an internal core containing silenced nongenic sequences*. Proc Natl Acad Sci U S A 103(20): 7688-7693.
- Clemson C. M., McNeil J. A., Willard H. F. and Lawrence J. B. (1996). *XIST RNA paints the inactive X chromosome at interphase: evidence for a novel RNA involved in nuclear/chromosome structure*. J Cell Biol 132(3): 259-275.
- Clerc P. and Avner P. (2006). *Random X-chromosome inactivation: skewing lessons for mice and men*. Curr Opin Genet Dev 16(3): 246-253.
- Cotton A. M., Lam L., Affleck J. G., Wilson I. M., Penaherrera M. S., McFadden D. E., Kobor M. S., Lam W. L., Robinson W. P. and Brown C. J. (2011). *Chromosome-wide DNA methylation analysis predicts human tissue-specific X inactivation*. Hum Genet 130(2): 187-201.
- de Hoon B., Monkhorst K., Riegman P., Laven J. S. and Gribnau J. (2015). *Buccal swab as a reliable predictor for X inactivation ratio in inaccessible tissues*. J Med Genet 52(11): 784-790.
- Deng X., Berletch J. B., Ma W., Nguyen D. K., Hiatt J. B., Noble W. S., Shendure J. and Disteche C. M. (2013). *Mammalian X upregulation is associated with enhanced transcription initiation, RNA half-life, and MOF-mediated H4K16 acetylation*. Dev Cell 25(1): 55-68.
- Deng X., Berletch J. B., Nguyen D. K. and Disteche C. M. (2014). *X chromosome regulation: diverse patterns in development, tissues and disease*. Nat Rev Genet 15(6): 367-378.
- Disteche C. M. (1999). *Escapees on the X chromosome*. Proc Natl Acad Sci U S A 96(25): 14180-14182.
- Disteche C. M. (2012). *Dosage compensation of the sex chromosomes*. Annu Rev Genet 46: 537-560.
- Disteche C. M. and Berletch J. B. (2015). *X-chromosome inactivation and escape*. J Genet 94(4): 591-599.
- Engreitz J. M., Pandya-Jones A., McDonel P., Shishkin A., Sirokman K., Surka C., Kadri S., Xing J., Goren A., Lander E. S., Plath K. and Guttman M. (2013). *The Xist lncRNA exploits three-dimensional genome architecture to spread across the X chromosome*. Science 341(6147): 1237973.
- Gendrel A. V. and Heard E. (2014). *Noncoding RNAs and epigenetic mechanisms during X-chromosome inactivation*. Annu Rev Cell Dev Biol 30: 561-580.
- Goodier J. L. and Kazazian H. H., Jr. (2008). *Retrotransposons revisited: the restraint and rehabilitation of parasites*. Cell 135(1): 23-35.
- Graves J. A. (2006). *Sex chromosome specialization and degeneration in mammals*. Cell 124(5): 901-914.
- Hansen R. S., Stoger R., Wijmenga C., Stanek A. M., Canfield T. K., Luo P., Matarazzo M. R., D'Esposito M., Feil R., Gimelli G., Weemaes C. M., Laird C. D. and Gartler S. M. (2000). *Escape from gene silencing in ICF syndrome: evidence for advanced replication time as a major determinant*. Hum Mol Genet 9(18): 2575-2587.

- Hellman A. and Chess A. (2007). *Gene body-specific methylation on the active X chromosome*. Science 315(5815): 1141-1143.
- Holstege H., Pfeiffer W., Sie D., Hulsman M., Nicholas T. J., Lee C. C., Ross T., Lin J., Miller M. A., Ylstra B., Meijers-Heijboer H., Brugman M. H., Staal F. J., Holstege G., Reinders M. J., Harkins T. T., Levy S. and Sistermans E. A. (2014). *Somatic mutations found in the healthy blood compartment of a 115-yr-old woman demonstrate oligoclonal hematopoiesis*. Genome Res 24(5): 733-742.
- Jobanputra V., Levy B., Kinney A., Brown S., Shirazi M., Yu C., Kline J. and Warburton D. (2012). *Copy number changes on the X chromosome in women with and without highly skewed X-chromosome inactivation*. Cytogenet Genome Res 136(4): 264-269.
- Johnston C. M., Lovell F. L., Leongamornlert D. A., Stranger B. E., Dermitzakis E. T. and Ross M. T. (2008). *Large-scale population study of human cell lines indicates that dosage compensation is virtually complete*. PLoS Genet 4(1): e9.
- Julien P., Brawand D., Soumillon M., Necsulea A., Liechti A., Schutz F., Daish T., Grutzner F. and Kaessmann H. (2012). *Mechanisms and evolutionary patterns of mammalian and avian dosage compensation*. PLoS Biol 10(5): e1001328.
- Khalil A. M., Boyar F. Z. and Driscoll D. J. (2004). *Dynamic histone modifications mark sex chromosome inactivation and reactivation during mammalian spermatogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A 101(47): 16583-16587.
- Koren A. and McCarroll S. A. (2014). *Random replication of the inactive X chromosome*. Genome Res 24(1): 64-69.
- Kutsche R. and Brown C. J. (2000). *Determination of X-chromosome inactivation status using X-linked expressed polymorphisms identified by database searching*. Genomics 65(1): 9-15.
- Lahn B. T. and Page D. C. (1999). *Four evolutionary strata on the human X chromosome*. Science 286(5441): 964-967.
- Latt S. A. (1973). *Microfluorometric detection of deoxyribonucleic acid replication in human metaphase chromosomes*. Proc Natl Acad Sci U S A 70(12): 3395-3399.
- Lee J. T., Davidow L. S. and Warshawsky D. (1999). *Tsix, a gene antisense to Xist at the X-inactivation centre*. Nat Genet 21(4): 400-404.
- Li X. (2011). *Sex chromosomes and sex chromosome abnormalities*. Clin Lab Med 31(4): 463-479, vii.
- Lin H., Halsall J. A., Antczak P., O'Neill L. P., Falciani F. and Turner B. M. (2011). *Relative overexpression of X-linked genes in mouse embryonic stem cells is consistent with Ohno's hypothesis*. Nat Genet 43(12): 1169-1170; author reply 1171-1162.
- Livernois A. M., Graves J. A. and Waters P. D. (2012). *The origin and evolution of vertebrate sex chromosomes and dosage compensation*. Heredity (Edinb) 108(1): 50-58.
- Lyon M. F. (1961). *Gene action in the X-chromosome of the mouse (Mus musculus L.)*. Nature 190: 372-373.
- Lyon M. F. (1962). *Sex chromatin and gene action in the mammalian X-chromosome*. Am J Hum Genet 14: 135-148.

- Lyon M. F. (1988). *The William Allan memorial award address: X-chromosome inactivation and the location and expression of X-linked genes*. Am J Hum Genet 42(1): 8-16.
- Lyon M. F. (1998). *X-chromosome inactivation: a repeat hypothesis*. Cytogenet Cell Genet 80(1-4): 133-137.
- Mak W., Nesterova T. B., de Napoles M., Appanah R., Yamanaka S., Otte A. P. and Brockdorff N. (2004). *Reactivation of the paternal X chromosome in early mouse embryos*. Science 303(5658): 666-669.
- Mank J. E., Hosken D. J. and Wedell N. (2011). *Some inconvenient truths about sex chromosome dosage compensation and the potential role of sexual conflict*. Evolution 65(8): 2133-2144.
- McNeil J. A., Smith K. P., Hall L. L. and Lawrence J. B. (2006). *Word frequency analysis reveals enrichment of dinucleotide repeats on the human X chromosome and [GATA]_n in the X escape region*. Genome Res 16(4): 477-484.
- Mengel-From J., Thinggaard M., Christiansen L., Vaupel J. W., Orstavik K. H. and Christensen K. (2012). *Skewed X inactivation and survival: a 13-year follow-up study of elderly twins and singletons*. Eur J Hum Genet 20(3): 361-364.
- Mercer C. L., Lachlan K., Karcianas A., Affara N., Huang S., Jacobs P. A. and Thomas N. S. (2013). *Detailed clinical and molecular study of 20 females with Xq deletions with special reference to menstruation and fertility*. Eur J Med Genet 56(1): 1-6.
- Migeon B. R. (1998). *Non-random X chromosome inactivation in mammalian cells*. Cytogenet Cell Genet 80(1-4): 142-148.
- Migeon B. R. (2016). *An overview of X inactivation based on species differences*. Semin Cell Dev Biol.
- Migeon B. R., Chowdhury A. K., Dunston J. A. and McIntosh I. (2001). *Identification of TSIX, encoding an RNA antisense to human XIST, reveals differences from its murine counterpart: implications for X inactivation*. Am J Hum Genet 69(5): 951-960.
- Migeon B. R. and Haisley-Royster C. (1998). *Familial skewed X inactivation and X-linked mutations: unbalanced X inactivation is a powerful means to ascertain X-linked genes that affect cell proliferation*. Am J Hum Genet 62(6): 1555-1557; author reply 1557-1558.
- Migeon B. R., Lee C. H., Chowdhury A. K. and Carpenter H. (2002). *Species differences in TSIX/Tsix reveal the roles of these genes in X-chromosome inactivation*. Am J Hum Genet 71(2): 286-293.
- Morishima A., Grumbach M. M. and Taylor J. H. (1962). *Asynchronous duplication of human chromosomes and the origin of sex chromatin*. Proc Natl Acad Sci U S A 48: 756-763.
- Mortazavi A., Williams B. A., McCue K., Schaeffer L. and Wold B. (2008). *Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq*. Nat Methods 5(7): 621-628.
- Musalkova D., Minks J., Storkanova G., Dvorakova L. and Hrebicek M. (2015). *Identification of novel informative loci for DNA-based X-inactivation analysis*. Blood Cells Mol Dis 54(2): 210-216.
- Nguyen D. K. and Disteche C. M. (2006). *Dosage compensation of the active X chromosome in mammals*. Nat Genet 38(1): 47-53.

- Ohhata T., Hoki Y., Sasaki H. and Sado T. (2008). *Crucial role of antisense transcription across the Xist promoter in Tsix-mediated Xist chromatin modification*. Development 135(2): 227-235.
- Orstavik K. H. (2009). *X chromosome inactivation in clinical practice*. Hum Genet 126(3): 363-373.
- Papp B., Pal C. and Hurst L. D. (2003). *Dosage sensitivity and the evolution of gene families in yeast*. Nature 424(6945): 194-197.
- Payer B. and Lee J. T. (2008). *X chromosome dosage compensation: how mammals keep the balance*. Annu Rev Genet 42: 733-772.
- Perry P. and Wolff S. (1974). *New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids*. Nature 251(5471): 156-158.
- Pessia E., Engelstadter J. and Marais G. A. (2014). *The evolution of X chromosome inactivation in mammals: the demise of Ohno's hypothesis?* Cell Mol Life Sci 71(8): 1383-1394.
- Pfeifer G. P., Steigerwald S. D., Mueller P. R., Wold B. and Riggs A. D. (1989). *Genomic sequencing and methylation analysis by ligation mediated PCR*. Science 246(4931): 810-813.
- Plagnol V., Uz E., Wallace C., Stevens H., Clayton D., Ozcelik T. and Todd J. A. (2008). *Extreme clonality in lymphoblastoid cell lines with implications for allele specific expression analyses*. PLoS One 3(8): e2966.
- Prothero K. E., Stahl J. M. and Carrel L. (2009). *Dosage compensation and gene expression on the mammalian X chromosome: one plus one does not always equal two*. Chromosome Res 17(5): 637-648.
- Pugacheva E. M., Tiwari V. K., Abdullaev Z., Vostrov A. A., Flanagan P. T., Quitschke W. W., Loukinov D. I., Ohlsson R. and Lobanenko V. V. (2005). *Familial cases of point mutations in the XIST promoter reveal a correlation between CTCF binding and pre-emptive choices of X chromosome inactivation*. Hum Mol Genet 14(7): 953-965.
- Rastan S. (1983). *Non-random X-chromosome inactivation in mouse X-autosome translocation embryos--location of the inactivation centre*. J Embryol Exp Morphol 78: 1-22.
- Rego A., Sinclair P. B., Tao W., Kireev I. and Belmont A. S. (2008). *The facultative heterochromatin of the inactive X chromosome has a distinctive condensed ultrastructure*. J Cell Sci 121(Pt 7): 1119-1127.
- Rupert J. L., Brown C. J. and Willard H. F. (1995). *Direct detection of non-random X chromosome inactivation by use of a transcribed polymorphism in the XIST gene*. Eur J Hum Genet 3(6): 333-343.
- Saare M., Belousova A., Punab M., Peters M., Haller K., Ausmees K., Poolamets O., Karro H., Metspalu A. and Salumets A. (2008). *Androgen receptor gene haplotype is associated with male infertility*. Int J Androl 31(4): 395-402.
- Sado T., Hoki Y. and Sasaki H. (2005). *Tsix silences Xist through modification of chromatin structure*. Dev Cell 9(1): 159-165.
- Sado T. and Sakaguchi T. (2013). *Species-specific differences in X chromosome inactivation in mammals*. Reproduction 146(4): R131-139.

- Salido E. C., Yen P. H., Mohandas T. K. and Shapiro L. J. (1992). ***Expression of the X-inactivation-associated gene XIST during spermatogenesis***. Nat Genet 2(3): 196-199.
- Sandovici I., Naumova A. K., Leppert M., Linares Y. and Sapienza C. (2004). ***A longitudinal study of X-inactivation ratio in human females***. Hum Genet 115(5): 387-392.
- Schluth C., Cossee M., Girard-Lemaire F., Carelle N., Dollfus H., Jeandidier E. and Flori E. (2007). ***Phenotype in X chromosome rearrangements: pitfalls of X inactivation study***. Pathol Biol (Paris) 55(1): 29-36.
- Selig S., Okumura K., Ward D. C. and Cedar H. (1992). ***Delineation of DNA replication time zones by fluorescence in situ hybridization***. EMBO J 11(3): 1217-1225.
- Sharp A. J., Stathaki E., Migliavacca E., Brahmachary M., Montgomery S. B., Dupre Y. and Antonarakis S. E. (2011). ***DNA methylation profiles of human active and inactive X chromosomes***. Genome Res 21(10): 1592-1600.
- Simon M. D., Pinter S. F., Fang R., Sarma K., Rutenberg-Schoenberg M., Bowman S. K., Kesner B. A., Maier V. K., Kingston R. E. and Lee J. T. (2013). ***High-resolution Xist binding maps reveal two-step spreading during X-chromosome inactivation***. Nature 504(7480): 465-469.
- Sisdelli L., Vidi A. C., Moyses-Oliveira M., Di Battista A., Bortolai A., Moretti-Ferreira D., da Silva M. R., Melaragno M. I. and Carvalheira G. (2016). ***Incorporation of 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) as a novel strategy for identification of the skewed X inactivation pattern in balanced and unbalanced X-rearrangements***. Hum Genet 135(2): 185-192.
- Skaletsky H., Kuroda-Kawaguchi T., Minx P. J., Cordum H. S., Hillier L., Brown L. G., Repping S., Pyntikova T., Ali J., Bieri T., Chinwalla A., Delehaunty A., Delehaunty K., Du H., Fewell G., Fulton L., Fulton R., Graves T., Hou S. F., Latrielle P., Leonard S., Mardis E., Maupin R., McPherson J., Miner T., Nash W., Nguyen C., Ozersky P., Pepin K., Rock S., Rohlfing T., Scott K., Schultz B., Strong C., Tin-Wollam A., Yang S. P., Waterston R. H., Wilson R. K., Rozen S. and Page D. C. (2003). ***The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes***. Nature 423(6942): 825-837.
- Swierczek S. I., Piterkova L., Jelinek J., Agarwal N., Hammoud S., Wilson A., Hickman K., Parker C. J., Cairns B. R. and Prchal J. T. (2012). ***Methylation of AR locus does not always reflect X chromosome inactivation state***. Blood 119(13): e100-109.
- Vacca M., Della Ragione F., Scalabri F. and D'Esposito M. (2016). ***X inactivation and reactivation in X-linked diseases***. Semin Cell Dev Biol.
- Wang Z., Willard H. F., Mukherjee S. and Furey T. S. (2006). ***Evidence of influence of genomic DNA sequence on human X chromosome inactivation***. PLoS Comput Biol 2(9): e113.
- Wolff D. J., Brown C. J., Schwartz S., Duncan A. M., Surti U. and Willard H. F. (1994). ***Small marker X chromosomes lack the X inactivation center: implications for karyotype/phenotype correlations***. Am J Hum Genet 55(1): 87-95.
- Wolff D. J., Gustashaw K. M., Zurcher V., Ko L., White W., Weiss L., Van Dyke D. L., Schwartz S. and Willard H. F. (1997). ***Deletions in Xq26.3-q27.3 including FMR1 result in a severe phenotype in a male and variable phenotypes in females depending upon the X inactivation pattern***. Hum Genet 100(2): 256-261.

- Yang C., Chapman A. G., Kelsey A. D., Minks J., Cotton A. M. and Brown C. J. (2011). *X-chromosome inactivation: molecular mechanisms from the human perspective*. Hum Genet 130(2): 175-185.
- Zechner U., Wilda M., Kehrer-Sawatzki H., Vogel W., Fundele R. and Hameister H. (2001). *A high density of X-linked genes for general cognitive ability: a run-away process shaping human evolution?* Trends Genet 17(12): 697-701.
- Zhang Y. E., Vibranovski M. D., Landback P., Marais G. A. and Long M. (2010). *Chromosomal redistribution of male-biased genes in mammalian evolution with two bursts of gene gain on the X chromosome*. PLoS Biol 8(10).
- Zitzmann M., Bongers R., Werler S., Bogdanova N., Wistuba J., Kliesch S., Gromoll J. and Tuttelmann F. (2015). *Gene expression patterns in relation to the clinical phenotype in Klinefelter syndrome*. J Clin Endocrinol Metab 100(3): E518-523.

Kasutatud veebiaadressid

[1]	Ensembl	http://www.ensembl.org/	20.05.2016
[2]	Genetics Home Reference	https://ghr.nlm.nih.gov/chromosome/X	26.05.2016
[3]	Fragmentanalüüs (Thermo Fisher Scientific)	https://www.thermofisher.com/ee/en/home/life-science/sequencing/fragment-analysis/fragment-analysis-fundamentals/fragment-analysis-software-data-analysis.html	23.05.2016
[4]	R Project	https://www.r-project.org/	24.05.2016
[5]	Database of Genomic Variants	http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home	24.05.2016

LISAD

Lisa 1. Töös kasutatud praimerite järjestused

Kromosoom	Praimer	Järjestus 5'→3'	Pikkus (bp)	Tm
X	<i>Forward</i>	Fam-GTCTACCCTCGGCCGCGTC	20	69
	<i>Reverse</i>	TAGCCTGTGGGGCCTCTACG	20	65

Lisa 2. Informatiivsete naiste andmed

I grupi andmed

Koopiaarv 1 tähistab deletsiooni, 3 tähistab duplikatsiooni. Geenide esimene number tähistab valke kodeerivaid geene ja teine number RNA geene vastavas regioonis, „-“, tähistab vastavate geenide puudumist.

Kood	Vanus	Koopiarv	Alugs (bp)	Lõpp (bp)	Pikkus (bp)	Geenid	XCI
001	37	3	4 065 592	4 229 228	163 637	-/-	64,46
002	72	3	6 456 940	8 135 053	1 678 114	5/5	43,65
003	20	3	6 456 940	8 135 053	1 678 114	5/5	62,66
004	19	3	6 456 940	8 135 053	1 678 114	5/5	64,96
005	60	3	6 470 011	6 837 426	367 416	1/2	50,79
006	36	3	6 497 085	6 664 300	167 216	1/1	41,46
007	23	3	6 497 085	6 864 358	367 274	1/2	82,41
008	29	3	6 497 085	8 135 053	1 637 969	5/5	62,80
009	55	3	6 507 158	8 135 053	1 627 896	5/5	15,07
010	72	1	7 335 191	7 478 218	143 028	1/-	13,65
011	85	1	7 566 613	7 820 766	254 154	-/-	65,30
012	25	3	7 819 527	7 980 930	161 404	2/-	26,77
013	41	3	8 076 813	8 432 715	355 903	1/1	35,78
014	24	3	8 253 271	8 385 492	132 222	-/-	51,05
015	76	3	8 862 525	9 012 656	150 132	-/1	38,41
016	29	3	22 818 110	22 876 079	57 970	-/1	20,70
017	52	3	22 818 110	22 876 079	57 970	-/1	29,70

Kood	Vanus	Koopiarv	Alugs (bp)	Lõpp (bp)	Pikkus (bp)	Geenid	XCI
018	64	3	22 818 110	22 876 079	57 970	-/1	37,08
019	45	1	23 031 264	23 135 355	104 092	-/2	12,18
020	34	3	26 240 406	26 472 204	231 799	-/-	76,56
021	82	3	33 643 684	34 333 522	689 839	1/2	22,39
022	75	1	35 302 556	35 593 186	290 631	-/-	8,26
023	38	3	38 490 844	38 628 467	137 624	2/1	45,28
024	63	3	38 607 438	38 885 093	277 656	3/2	63,46
025	87	3	43 440 465	43 612 708	172 244	-/-	71,26
026	57	1	47 881 362	47 970 727	89 366	1/-	25,38
027	63	1	47 881 362	47 970 727	89 366	1/-	44,79
028	40	1	47 881 362	47 970 727	89 366	1/-	65,38
029	43	1	47 881 362	47 970 727	89 366	1/-	77,72
030	23	1	47 881 362	47 970 727	89 366	1/-	82,88
031	34	1	47 881 362	48 117 763	236 402	4/-	77,86
032	21	1	47 911 871	47 970 295	58 425	1/-	9,49
033	78	1	47 911 871	47 970 727	58 857	1/-	30,90
034	41	1	47 911 871	47 970 727	58 857	1/-	83,97
035	71	1	47 911 871	47 970 727	58 857	1/-	88,63
036	37	3	47 911 871	47 970 727	58 857	1/-	60,14
037	33	3	47 911 871	47 970 727	58 857	1/-	68,48
038	26	1	47 911 871	47 972 602	60 732	1/-	47,34
039	37	1	47 911 871	47 972 602	60 732	1/-	72,12
040	42	3	57 432 689	57 928 734	496 046	4/-	99,66
041	75	3	57 801 922	58 483 247	681 326	1/-	82,81
042	65	3	58 339 545	62 038 249	3 698 705	-/-	52,27
043	37	3	65 813 960	65 914 654	100 695	-/-	35,80
044	91	3	65 813 960	65 914 654	100 695	-/-	72,33
045	83	1	68 946 979	69 127 562	180 584	-/-	45,20
046	53	3	74 823 846	75 340 588	516 743	3/1	57,26
047	23	3	90 287 407	90 375 452	88 046	-/-	29,26
048	27	3	90 287 407	90 375 452	88 046	-/-	55,30
049	19	3	90 287 407	90 394 689	107 283	-/-	60,71
050	28	3	98 984 027	99 155 813	171 787	-/-	57,53

Kood	Vanus	Koopiarv	Alugs (bp)	Lõpp (bp)	Pikkus (bp)	Geenid	XCI
051	23	3	103 349 129	103 986 868	637 740	12/3	52,26
052	21	3	111 644 502	111 828 653	184 152	2/1	18,48
053	25	3	115 132 834	115 290 138	157 305	3/1	45,47
054	28	1	116 498 965	116 573 666	74 702	-/-	59,78
055	36	3	120 629 826	121 300 517	670 692	16/-	76,74
056	33	1	120 803 943	120 930 090	126 148	3/-	32,25
057	35	1	120 819 108	120 920 493	101 386	3/-	22,58
058	32	1	120 819 108	120 920 493	101 386	3/-	41,16
059	52	1	120 819 108	120 920 493	101 386	3/-	42,01
060	68	1	120 819 108	120 920 493	101 386	3/-	50,60
061	33	1	120 819 108	120 920 493	101 386	3/-	80,19
062	20	1	120 819 108	120 930 090	110 983	3/-	21,48
063	56	1	120 860 880	120 920 493	59 614	3/-	13,02
064	53	1	120 860 880	120 920 493	59 614	3/-	43,32
065	43	1	126 147 941	126 297 929	149 989	1/-	45,78
066	75	1	127 029 560	127 505 327	475 768	-/-	46,67
067	23	3	130 478 545	130 949 827	471 283	1/1	52,28
068	53	3	130 826 305	130 949 827	123 523	1/-	76,72
069	22	3	130 894 958	131 510 113	615 156	3/2	64,11
070	66	3	140 348 507	140 559 665	211 159	1/2	8,60
071	28	3	140 348 507	140 559 665	211 159	1/2	70,50
072	78	1	140 348 507	140 759 327	410 821	1/4	77,84
073	41	3	140 349 251	140 559 503	210 253	1/2	38,16
074	38	3	140 349 251	140 559 503	210 253	1/2	41,70
075	20	3	140 349 251	140 559 503	210 253	1/2	51,49
076	23	3	140 349 251	140 559 503	210 253	1/2	60,25
077	27	3	140 349 251	140 559 503	210 253	1/2	78,85
078	22	1	140 349 251	140 786 490	437 240	2/4	62,26
079	26	3	140 376 252	140 559 503	183 252	1/2	54,50
080	64	3	144 955 839	145 401 263	445 425	1/1	76,58
081	39	3	148 629 897	148 838 282	208 386	1/1	64,44
082	77	3	148 652 476	149 369 250	716 775	1/2	19,45
083	40	3	148 888 090	149 013 963	125 874	1/-	86,51

Kood	Vanus	Koopiarv	Alugs (bp)	Lõpp (bp)	Pikkus (bp)	Geenid	XCI
084	39	3	152 503 241	152 727 361	224 121	3/-	87,18
085	71	1	154 078 946	154 835 342	756 397	31/7	7,87

II grupi andmed

Kood	Vanus	XCI
086	18	23,51
087	18	29,99
088	19	36,20
089	19	59,23
090	23	26,90
091	23	34,95
092	26	30,71
093	26	55,03
094	27	30,34
095	28	34,12
096	28	69,08
097	29	31,45
098	30	80,22
099	31	79,58
100	32	18,81
101	33	19,84
102	33	62,24
103	34	68,37
104	35	77,63
105	36	83,84
106	37	49,56
107	38	84,46
108	45	12,01
109	45	20,83

Kood	Vanus	XCI
110	45	27,60
111	45	41,12
112	45	89,87
113	46	46,80
114	46	64,10
115	46	98,86
116	47	36,27
117	47	64,94
118	47	88,67
119	48	18,13
120	48	23,34
121	49	19,48
122	49	77,73
123	50	31,29
124	51	21,09
125	51	50,41
126	52	53,74
127	52	59,69
128	52	90,59
129	53	51,99
130	56	20,33
131	56	70,18
132	58	22,61
133	58	27,97

Kood	Vanus	XCI
134	63	14,19
135	65	14,56
136	66	69,60
137	67	26,38
138	67	27,62
139	68	12,86
140	68	78,48
141	68	83,58
142	68	93,68
143	69	19,66
144	69	51,37
145	69	62,35
146	69	68,92
147	69	82,65
148	71	62,57
149	72	11,64
150	72	12,44
151	76	49,95
152	76	64,60
153	76	79,15
154	77	2,93
155	77	11,01
156	77	13,13
157	77	19,49

Kood	Vanus	XCI
158	77	33,75
159	77	70,85
160	78	12,55
161	78	13,16
162	78	19,16

Kood	Vanus	XCI
163	78	48,26
164	83	5,06
165	83	45,80
166	83	73,43
167	83	74,05

Kood	Vanus	XCI
168	83	92,72
169	85	73,58
170	87	38,75
171	87	93,58

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Julia Bokajeva (sünnikuupäev: 05.12.1991.)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose Inimese X kromosoomi aberratsioonide mõju X kromosoomi inaktivatsiooni kallutatusele, mille juhendajad on Ants Kurg, PhD, ja Olga Tšuiko, Msc

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 27.05.2016